

Entwicklung und Untersuchung von
Apolipoprotein modifizierten Albumin-Nanopartikeln
zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich

Biochemie, Chemie und Pharmazie

der Johann Wolfgang Goethe – Universität

Frankfurt am Main

von

Kerstin Michaelis

aus Detmold

Frankfurt am Main, 2005

vom Fachbereich Biochemie, Chemie und Pharmazie der
Johann Wolfgang Goethe – Universität als Dissertation angenommen

Dekan: Prof. Dr. H. Schwalbe

Gutachter: Prof. Dr. J. Kreuter

Prof. Dr. J.B. Dressman

Datum der Disputation: 05.12.05

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
2. THEORETISCHER TEIL	3
2.1. Blut-Hirn-Schranke (BHS)	3
2.1.1. Aufbau	3
2.1.2. Funktion	5
2.1.3. BHS Transport	5
2.1.4. BHS Modelle	8
2.1.5. Strategien zur Überwindung der BHS	11
2.2. „Drug Targeting“	11
2.2.1. Konzept des „Drug Targeting“	11
2.2.2. Liganden für „Drug Targeting“-Anwendungen	12
2.2.2.1. Lipoproteine	13
2.2.2.2. LDL-Rezeptor-Genfamilie	14
2.2.2.3. Zellaufnahme von Lipoproteinen über Rezeptoren	15
2.3. Trägersysteme	16
2.3.1. Trägersysteme im Allgemeinen	16
2.3.2. Nanopartikel	17
2.3.2.1. Ausgangsmaterialien und Herstellungsverfahren	17
2.3.2.2. Eigenschaften und Verwendung	18
2.4. Systementwicklung zur Überwindung der BHS	18
2.4.1. Körperverteilungsstudien	19
2.4.2. Zellaufnahmestudien	19
2.4.3. Tierversuche	19
2.4.4. Plasmaadsorptionsmuster	20
2.4.5. Apolipoprotein E als möglicher Schlüssel zur Überwindung der BHS	20
3. MATERIAL UND METHODEN	21

3.1. Material	21
3.1.1. Laborgeräte	21
3.1.2. Verbrauchsmaterialien	22
3.1.3. Chemikalien und Reagenzien	22
3.1.3.1. Nanopartikelherstellung	22
3.1.3.2. Nanopartikelmodifikation	23
3.1.3.3. Nanopartikelcharakterisierung	23
3.1.3.4. Wirkstoffbeladung	23
3.1.3.5. Gelelektrophorese (SDS-Page)	24
3.1.3.6. Zellkultur	25
3.1.3.7. Zellen	25
3.1.4. Puffer und Lösungen	26
3.1.4.1. Nanopartikelmodifikation	26
3.1.4.2. Gelelektrophorese (SDS-Page)	27
3.1.4.3. HPLC Fließmittel	29
3.1.4.4. Zellkultur	29
3.2. Nanopartikelherstellung	30
3.3. Nanopartikelcharakterisierung	30
3.3.1. Gehaltsbestimmung	30
3.3.2. Partikelgröße	31
3.3.3. Aminogruppenbestimmung auf der Oberfläche	31
3.4. Oberflächenmodifikationen	32
3.4.1. Avidin / NeutrAvidin®-modifizierte Nanopartikel	32
3.4.1.1. Einführung von SH-Gruppen	33
3.4.1.1.1. Einführung von SH-Gruppen auf der Oberfläche von HSA-NP	33
3.4.1.1.2. Einführung von SH-Gruppen in Avidin / NeutrAvidin®	33
3.4.1.1.3. Einführung von SH-Gruppen in Apolipoprotein E	34
3.4.1.2. Quantitative Bestimmung reaktiver Sulfhydrylgruppen an der Partikeloberfläche bzw. am Protein	35
3.4.1.3. Proteinaktivierung mit bifunktionalen Crosslinkern	35
3.4.1.3.1. Aktivierung von Avidin / NeutrAvidin®	35
3.4.1.3.2. Aktivierung von HSA-NP	36

3.4.1.4.	Konjugation der aktivierten bzw. thiolierten Proteinkomponenten	37
3.4.1.4.1.	Konjugation des aktivierten Avidins / NeutrAvidins® an thiolierte NP	37
3.4.1.4.2.	Konjugation der aktivierten NP an thioliertes Avidin / NeutrAvidin®	37
3.4.1.4.3.	Konjugation der aktivierten NP an thioliertes ApoE	38
3.4.1.5.	Funktionalitätsbestimmung des eingeführten Avidins / NeutrAvidins®	38
3.4.1.6.	Bindung von Liganden über das NeutrAvidin® / Biotin-System	39
3.4.1.6.1.	Biotinylierung von Liganden	39
3.4.1.6.1.1.	Biotinylierung von ApoE	39
3.4.1.6.1.2.	Biotinylierung von anti-HER2-Antikörpern	40
3.4.1.6.2.	Quantifizierung des Biotinylierungsgrades	40
3.4.1.6.2.1.	Western Blot zur semiquantitativen Bestimmung des Biotinylierungsgrades von ApoE	40
3.4.1.6.2.2.	HABA-Assay zur Bestimmung des Biotinylierungsgrades von Antikörpern	41
3.4.1.6.3.	Bindung von biotinylierten Liganden an NeutrAvidin®-modifizierte Nanopartikel	41
3.4.1.6.3.1.	Biotin-ApoE-Bindung	41
3.4.1.6.3.2.	Biotin-anti-HER2-Antikörper Bindung	41
3.4.1.6.4.	Bestimmung der Biotin-Liganden Bindung an das NP-System	41
3.4.1.6.5.	Bestimmung der kovalenten Bindung von ApoE an aktivierte HSA-NP	43
3.4.2.	Loperamid	44
3.4.2.1.	Loperamid Beladung	44
3.4.2.2.	Loperamid Analytik	45
3.4.2.3.	Beladungsbestimmung	45
3.5.	Zellkultur	46
3.5.1.	Zellaufnahme von ApoE-PEG-Nanopartikeln mittels CLSM	46
3.5.2.	Zellaufnahme von Antikörper-beladenen Nanopartikeln	47
3.6.	<i>In vivo</i> Untersuchungen	48

3.6.1.	Tail-Flick-Test	48
3.6.2.	Versuchstiere	49
3.6.3.	Durchführung	50
3.6.4.	Zubereitungen	50
4.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	53
4.1.	Nanopartikelherstellung und Charakterisierung	57
4.1.1.	Gravimetrie	57
4.1.2.	Aminogruppen	57
4.2.	Herstellung Liganden-gekoppelter NeutrAvidin®-modifizierter Nanopartikel	59
4.2.1.	Avidin / NeutrAvidin®-modifizierte Nanopartikel	60
4.2.1.1.	Konventions-Methode	61
4.2.1.1.1.	SH-Gruppen Einführung	62
4.2.1.1.2.	Konjugation und Bindungseffizienz	63
4.2.1.2.	Umkehr-Methode	65
4.2.1.2.1.	SH-Gruppen Einführung	65
4.2.1.2.2.	Konjugation und Bindungseffizienz	65
4.2.1.3.	Funktionalitätsbestimmung des eingeführten Avidins / NeutrAvidins®	66
4.2.2.	Bindung von Liganden über das NeutrAvidin®/Biotin-System	68
4.2.2.1.	Biotinylierung von Liganden	69
4.2.2.2.	Quantifizierung des Biotinylierungsgrades	69
4.2.2.2.1.	Western Blot zur Bestimmung des Biotinylierungsgrades von ApoE	69
4.2.2.2.2.	HABA-Assay zur Bestimmung des Biotinylierungsgrades von Antikörpern	71
4.2.2.3.	Bindung von biotinylierten Liganden an NeutrAvidin®- modifizierte Nanopartikel	71
4.2.2.3.1.	Biotin-ApoE Bindung und Quantifizierung	71
4.2.2.3.2.	Biotin-anti-HER2-Antikörper Bindung und Quantifizierung	74
4.3.	Herstellung von HSA-NP mit direkt kovalent gebundenem Liganden	75

4.4. ApoE-Biotin/NeutrAvidin[®]-modifizierten NP vs. ApoE-PEG-NP	78
4.5. Loperamid	79
4.5.1. Loperamid-Analytik	79
4.5.2. Loperamid-Beladungsbestimmung	79
4.6. Zellkultur	82
4.6.1. Zellaufnahme von ApoE-modifizierten Nanopartikeln	82
4.6.2. Zellaufnahme von Antikörper-beladenen Nanopartikeln	87
4.6.2.1. Zellspezifische Bindung von Antikörper-beladenen NP	87
4.6.2.2. Kinetikstudie zur NP Aufnahme	89
4.6.2.3. CLSM-Untersuchung in SK-Br-3-Zellen	90
4.7. In vivo Untersuchungen	92
4.7.1. Versuch A mit ApoE-Biotin / NeutrAvidin [®] -modifizierten NP	92
4.7.2. Versuch B mit ApoE-PEG-NP	95
5. ZUSAMMENFASSUNG	99
5.1. Herstellung und Charakterisierung ligandenmodifizierter HSA-NP	99
5.2. In vitro Untersuchungen von ligandenmodifizierten HSA-NP	101
5.3. In vivo Untersuchungen von ligandenmodifizierten HSA-NP	101
6. LITERATUR	103
7. LEBENSLAUF	111

Verwendete Abkürzungen

AFM	Atomic Force Microscopy
AP	Alkalische Phosphatase
ApoE	Apolipoprotein E
ApoB	Apolipoprotein B
ApoJ	Apolipoprotein J
APS	Ammoniumpersulfat
Av	Avidin
BCA	Bicinchoninic acid
B4F	Biotin-4-Fluorescein
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat
BHS	Blut-Hirn-Schranke
CLSM	Konfokales Laserscanning Mikroskop
ConA	Concanavalin A
DMEM	Dulbeccos's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluorescence activated cell sorter
FCS	Fötales Kälber Serum
GA	Glutaraldehyd
GMP	Good manufacturing Practice
HPLC	High pressure liquid chromatography
HSA	Humanes Serumalbumin
Lsg	Lösung
MG	Molekulargewicht
MQ	Milli Q-Wasser
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NAv	NeutrAvidin®
NBT	Nitroblue Tetrazolium
NP	Nanopartikel
PBS	Phosphat buffered saline
PBCA	Polybutylcyanoacrylat
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie

PMMA	Polymethylmetacrylat
RES	Reticuloendotheliales System
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEER	transendothelial electrical resistance
TBS	Tris buffered saline
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzensulfonsäure
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Üb	Überstand
WB	Western Blot
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

Das humane Gehirn ist vor dem unerwünschten Eindringen von Fremdstoffen durch die Blut-Hirn-Schranke (BHS) geschützt. Für die medikamentöse Therapie ist die Überwindung der BHS von Gehirnerkrankungen wie Alzheimer, Gehirntumoren oder anderen zerebralen Erkrankungen die Voraussetzung. Die wenigsten Arzneistoffe sind jedoch in der Lage, die BHS zu überwinden.

Darüber hinaus wäre es wünschenswert nicht nur die BHS zu überwinden, sondern eine gerichtete intrazerebrale Anreicherung im Rahmen eines „Drug Targeting“ zu erreichen.

So kommt es bei der Behandlung von Gehirntumoren mit Zytostatika zu starken Nebenwirkungen, da es bisher nicht möglich ist, den Wirkstoff im menschlichen Körper ohne invasiven Eingriff zielgerichtet an seinen Wirkort zu bringen und dort anzureichern. Bei der intravenösen Applikation von Wirkstoffen verteilen sich diese meist mehr oder weniger ungerichtet im Körper, was eine deutlich höhere Dosierung erforderlich macht, um eine ausreichend hohe Wirkstoffkonzentration am Zielort zu erhalten.

Ein Weg zur Verbesserung der Behandlung wäre somit das „Drug Targeting“, womit eine Modifikation des zu transportierenden Wirkstoffs oder Einsatz eines Trägersystems für den jeweiligen Wirkstoff gemeint ist, um dadurch eine höhere Affinität zum gewünschten Zielort zu erreichen.

Eine Möglichkeit für den zielgerichteten Transport von Wirkstoffen stellen kolloidale Trägersysteme dar.

Kolloidale Trägersysteme wie Liposomen oder Nanopartikel sind meist sphärische Vehikel unter einem Mikrometer. Als Ausgangsmaterialien eignen sich synthetische oder natürliche Monomere, die durch geeignete Herstellungsverfahren zu Trägersystemen umgesetzt werden. Die verschiedenen Trägersysteme weisen bei Größe, Wirkstofftransportkapazität, Steuerbarkeit und Abbaubarkeit der Trägermaterialien im Organismus unterschiedliche Merkmale auf.

Kolloidale Trägersysteme lassen sich aufgrund ihrer geringen Größe intravenös applizieren ohne die Blutgefäße zu verstopfen. Im optimalen Fall haben die eingesetzten Ausgangsmaterialien der verwendeten Trägersysteme keine antigenen Eigenschaften und sind bioabbaubar ohne toxische Abbauprodukte

zu bilden. Für einen Wirkstofftransport können die Wirkstoffe über Adsorption an die Oberfläche der Systeme oder über Einschluss in die Partikelmatrix gebunden werden. Bei Wirkstoffeinschluss im Trägersystem kann ein Schutz des Wirkstoffs vor vorzeitigem Abbau erreicht bzw. auch eine gesteuerte oder verzögerte Freisetzung des Wirkstoffs durch den Abbau des Trägermaterials erzielt werden. Veränderungen an der Trägeroberfläche („Tensid-Coating“; Pegylierung) ermöglichen eine Beeinflussung der Körperverteilung der Trägersysteme. Bei proteinbasierten Trägersystemen ist eine Bindung von Liganden an der Oberfläche möglich, welche eine Zellaufnahme vermitteln können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Liganden-gekoppelte proteinbasierte Nanopartikel als Trägersystem zur Überwindung der BHS entwickelt, charakterisiert und evaluiert. Die Idee zur Entwicklung eines solchen Systems basiert auf vorangegangenen Untersuchungen zu Körperverteilung, Wirkstofftransport und Adsorptionsmustern von Acrylat Nanopartikeln. Diese Experimente ließen auf die Möglichkeit schließen, einen geeigneten Liganden, das Apolipoprotein E, für den Transport in das Gehirn gefunden zu haben.

Neben dem Liganden Apolipoprotein E zur Überwindung der BHS wurden auch Versuche mit anderen Liganden (Antikörpern) durchgeführt, um die Variabilität des Trägersystems zu untersuchen.

2. Theoretischer Teil

2.1. Blut-Hirn-Schranke (BHS)

Paul Ehrlich (1854 - 1915) war einer der ersten, der die Existenz der Blut-Hirn Schranke entdeckte. In seinem Artikel über „Das Sauerstoffbedürfnis des Organismus; eine farbenanalytische Studie“ (Berlin: Hirschwald) von 1885 beschreibt Ehrlich, dass es bei der intravenösen Injektion von Trypan Blau in Ratten zu keiner Farbverteilung in das Gehirn bzw. aus diesem heraus kommt. Dieser Versuch brachte erste Ergebnisse über die Existenz einer Barriere zwischen Gehirn und übrigen Körperkompartiment. Bis heute konnte viel über den Aufbau und die Funktion der damals entdeckten BHS herausgefunden werden.

2.1.1. Aufbau

Die BHS ist eine der wichtigsten und undurchlässigsten physiologischen Barrieren im humanen Organismus.

Sie besteht auf der einen Seite aus der endothelialen BHS und auf der anderen Seite aus der Schranke zwischen Blut und Zerebrospinalflüssigkeit. In der Hauptsache wird die Barrierefunktion der BHS durch hochkomplexe und hochverdichtete interzelluläre Adhäsionsstrukturen zwischen den spezialisierten Hirnendothelien, den sogenannten „*tight junctions*“, gewährleistet. Der kontrollierte und gerichtete Transport von Ionen und Molekülen, der zur Aufrechterhaltung von Konzentrationsgradienten zwischen Blut und ZNS vonnöten ist, wird durch spezifische in den Endothelzellen exprimierte Transportsysteme sichergestellt. Eine freie Diffusion durch die Endothelzellen ist nicht möglich, auch zeichnet sich die hohe Dichtigkeit der BHS durch die geringe vesikuläre und pinocytotische Aktivität aus. Im Vergleich zu peripheren Endothelzellen zeigen Hirnendothelzellen mit ihren „*tight junctions*“ einen extrem hohen elektrischen Widerstand ($1000 \Omega/\text{cm}^2$) (Huber et al., 2001; Pardridge et al., 2002a).

Anatomisch ist die BHS von Vertebraten in den spezialisierten Endothelzellen der Hirnkapillaren lokalisiert (Stögbauer, 2002). Dabei handelt es sich um einen Komplex aus Endothelzellen, Astrozyten, Pericyten und Nervenzellen (Abbildung 1).

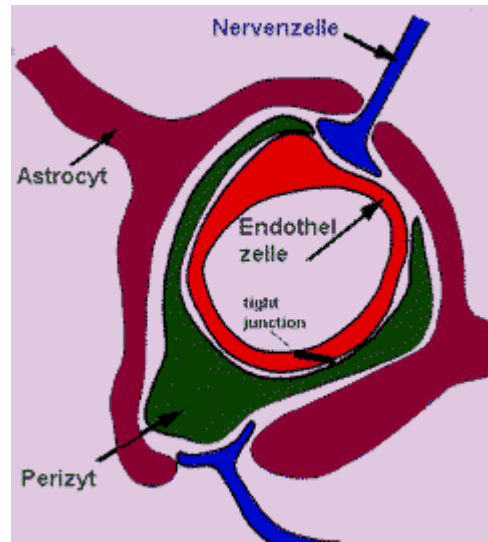


Abbildung 1 Schematische Darstellung eines Durchchnitts durch eine Hirnkapillare, Abbildung aus Stögbauer (2002).

Der Astrozyt steht sowohl mit der Kapillare als auch mit der Nervenzelle in Kontakt und spielt eine vermittelnde Rolle zwischen der BHS und den Nervenzellen.

Da die Nervenzellen kontinuierlich mit Nährstoffen versorgt werden müssen und umgekehrt ständig Abfallstoffe aus dem Gehirn heraustransportiert werden, muss ein Austausch von Substanzen in beide Richtungen garantiert werden. Dieser Austausch erfolgt über Transportersysteme wie sie im Abschnitt 2.1.3. beschrieben werden.

2.1.2. Funktion

Die BHS ist die maßgebliche Struktur für die Aufrechterhaltung der Homöostase des neuralen Parenchyms. Sie ist somit essentiell für die Funktionsfähigkeit des zentralen Nervensystems (ZNS). Die BHS schützt das Gehirn vor toxischen Komponenten, vor den beträchtlichen Änderungen der Blutzusammensetzung und dient der Aufrechterhaltung von Konzentrationsgradienten zwischen Blut und ZNS. Die zentrale pathophysiologische Bedeutung der BHS als Grundlage für die Funktion des ZNS zeigt sich im Verlauf von neurologischen Erkrankungen, die mit einer Funktionsminderung oder einem Funktionsverlust der BHS einhergehen. Zu diesen zählen äußerst schwerwiegende Erkrankungen wie die Meningitis, der intrazerebrale Abszess, Hirntumore und ischämische Hirninfarkte (Stögbauer, 2002; de Boer et al., 2003).

2.1.3. BHS Transport

Der Transport von Wirkstoffen ins Gehirn hängt von verschiedenen Parametern ab:

Zum Einen von der Verteilung und Bindung des Wirkstoffes im Blut. Wirkstoffe werden über das Blut im gesamten Körper verteilt und zusätzlich von Plasmaproteinen im Blut gebunden. Beide Vorgänge reduzieren die tatsächliche Konzentration des Wirkstoffes an der BHS.

Zum Anderen können die Stoffe aber auch metabolisiert werden, bevor sie das ZNS erreichen, wodurch ihre Wirkung verloren gehen oder zumindest reduziert werden kann.

In dem untenstehenden Schema (Abbildung 2) werden verschiedene Transportersysteme an der BHS dargestellt, welche im Weiteren näher erläutert werden. Ein möglicher Weg durch die BHS ist die parazelluläre Diffusion, welcher insbesondere für hydrophile Stoffe geeignet ist. Wichtig für diesen einfachen passiven Transport in das Gehirn sind besonders die physiko-chemischen Eigenschaften von Stoffen, wie beispielsweise Hydrophilie oder Lipophilie. Es konnte hierzu ein linearer Zusammenhang zwischen den log-P Werten von Wirkstoffen und ihrer Gehirngängigkeit bestimmt werden (Brodie et

al., 1960). Der parazelluläre Transport an der BHS wird von den „*tight junctions*“ erschwert und hängt von der Ladung der Moleküle ab.

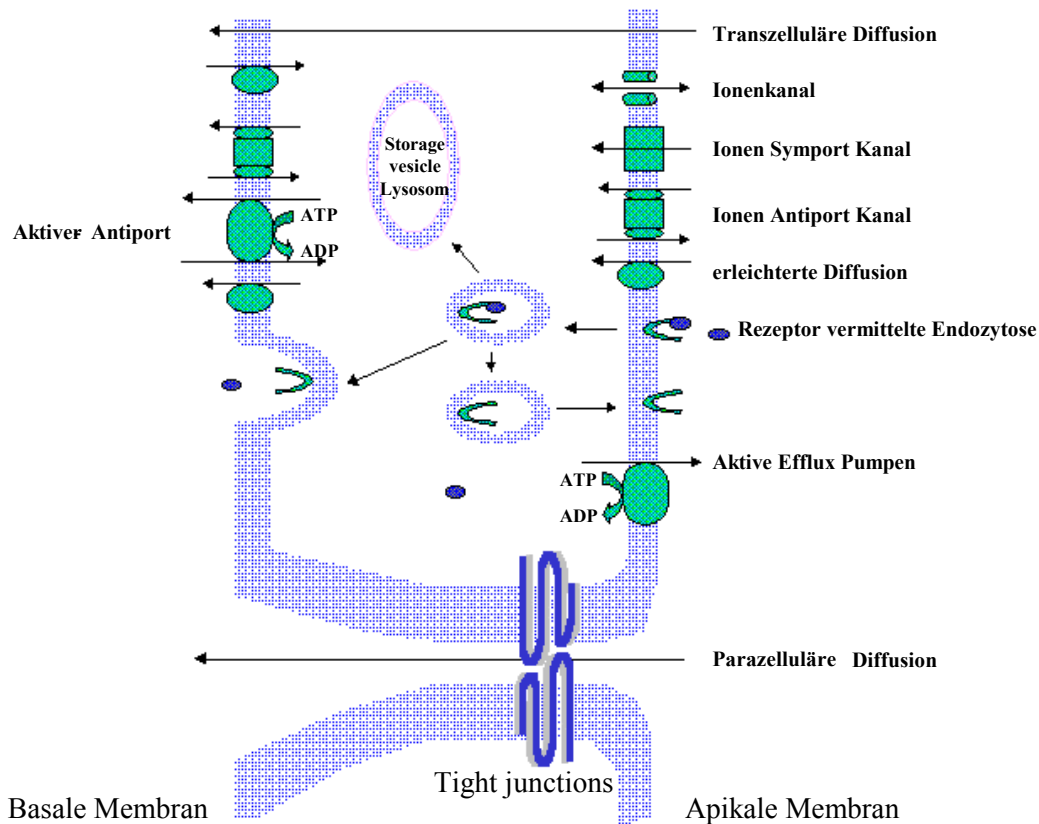


Abbildung 2 Transporter Systeme an der Blut-Hirn-Schranke
Abbildung aus <http://users.ahsc.arizona.edu/davis/bbbtra1.gif>

Neben dem erschwerten passiven Transport besteht auch die Möglichkeit des Flüssigphasen-vermittelten-, des adsorptiv-vermittelten-, des Rezeptor-vermittelten- und des Carrier-vermittelten-Transports (Pardridge et al., 2002b; de Boer et al., 2003).

Der adsorptiv-vermittelte Transport hängt von der negativen Ladung der Membran ab, ist unspezifisch und besonders für kationische oder kationisierte Verbindungen geeignet.

Der Flüssigphasen-vermittelte Transport ist ebenfalls ein unspezifischer nicht sättigbarer Transport und hängt vom Konzentrationsgradient der jeweiligen Verbindung ab. Beide oben beschriebenen Transportwege kommen in nur geringer Menge im gesunden Gehirn vor.

Eine größere Rolle spielen dagegen der Carrier-vermittelte und der Rezeptor-vermittelte Transport. Beide Wege sind sättigbare oder inhibierbare Prozesse.

Der Carrier-vermittelte Transport erfolgt über membranfixierte Transporter, während der Rezeptor-vermittelte Transport über die Internalisierung des Rezeptors mit seinen Liganden erfolgt. Bei der Internalisierung können größere Stoffe oder Partikel als beim Carrier-vermittelten Transport über die Membran gelangen. Beide Wege sind selektive bzw. spezifische Prozesse und können für den Transport von Substanzen in das Gehirn genutzt werden.

Carrier-vermittelter Transport:

Bei den Carriern handelt es sich um auf die Membran beschränkte und in ihr fixierte Transporter, welche Moleküle kleiner 600 Da aufnehmen. Die meisten dieser Systeme sind ATP- und temperaturabhängig und durch höhere Ligandenkonzentrationen sättigbar. Ihre Aktivität kann kompetitiv oder nichtkompetitiv inhibiert werden (de Boer et al., 2003).

Rezeptor-vermittelter Transport:

Auch dieser Transportweg ist mit seinen Rezeptoren in der Plasmamembran der Endothelzellen angesiedelt. Bei der Aufnahme über diesen Vermittler werden gebildete Ligand/Rezeptor-Komplexe internalisiert und zu den frühen Endosomen oder Lysosomen transportiert oder unterliegen einer Transzytose und die Rezeptoren werden dann zur Plasmamembran zurücktransportiert. Die Aufnahme von Rezeptorliganden über die Rezeptor-vermittelte Endozytose ist sättigbar, da diese von der Verfügbarkeit des Rezeptors an der Membranoberfläche abhängt. Der Prozess ist wie der Carrier-vermittelte energie- und temperaturabhängig. Da hier größere Verbindungen (Proteine, Antikörper, Peptide...) internalisiert werden, eignet sich dieser Prozess besser für ein „Drug Targeting“ (siehe 2.2.) (de Boer et al., 2003).

Endozytose:

Der Weg von der Zelloberfläche zu den Lysosomen beginnt bei der Endozytose. Dies ist ein Vorgang, durch den sich Zellen Makromoleküle, bestimmte Substanzen und in einigen Fällen sogar andere Zellen einverleiben. Eukaryontische Zellen können ihre Plasmamembran einstülpen und abschnüren. So können sie einen Teil des umgebenden Mediums aufnehmen (z.B. zur Nahrungsaufnahme). Das aufzunehmende Material wird immer weiter

von einem kleinen Teil der Plasmamembran eingehüllt, der sich zunächst einstülpt und dann abschnürt. Die Endozytose beginnt an der Plasmamembran und verläuft nach innen zu den Endosomen und Lysosomen (Alberts et al., 1997).

Clathrin-bedeckte Bereiche:

Die Endozytose, das Aufnehmen kleiner Plasmamembranstücke in das Innere von Zellen, beginnt meist in spezialisierten Bereichen der Plasmamembran, den „Clathrin-coated Pits“ (auch: „Acanthosomen“). Die Pits sind Einstülpungen der Membran, die auf der Zytosolseite mit dicht gepacktem Clathrin bekleidet sind. Die Clathrin-bedeckten Pits sind eine Möglichkeit, spezifisch über Rezeptor-vermittelte Endozytose Makromoleküle aufzunehmen. Die Makromoleküle binden an komplementäre Zelloberflächen-Rezeptoren, sammeln sich in den Coated Pits und gelangen so als Rezeptor-Makromolekül-Komplexe in den Clathrin bedeckten Vesikeln in die Zelle. Eine solche Aufnahme von Makromolekülen über „Clathrin-coated Pits“ wird am Beispiel der Lipoproteinartikel LDL in Abbildung 3 dargestellt.

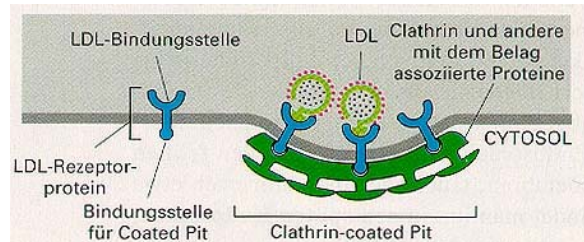


Abbildung 3 Schema von „Clathrin-coated Pits“, aus Alberts, B. et al.: Molekularbiologie der Zelle. VCH Weinheim 1997 Seite 733

Durch die Rezeptor-vermittelte Endozytose werden bestimmte Makromoleküle selektiv angereichert, dies steigert den Wirkungsgrad mit der einzelne Liganden aufgenommen werden um mehr als das 1000-fache. Auf diese Weise können selbst schwach konzentrierte Mengen aus der Extrazellulärflüssigkeit in großen Mengen spezifisch aufgenommen werden, ohne dass große Flüssigkeitsmengen in die Zelle gelangen (Alberts et al., 1997).

2.1.4. BHS Modelle

Für Untersuchungen zum Wirkstofftransport über die BHS stehen zum einen *in vitro* Modelle der BHS zur Verfügung, sowie geeignete *in vivo* Tiermodelle.

Zu den in vitro Systemen zählen zum Beispiel Hirndothelzell/Astrozyten Co-Kulturen. Die meisten der bis heute entwickelten *in vitro* BHS-Modelle basieren auf Kulturen isolierter Endothelzellen aus bovinen (Bowman et al., 1983), murinen (Song and Pachter, 2003) oder porcinen (Franke et al., 2000) Hirnkapillaren, sogenannte Primärkulturen.

Ein gängiges Verfahren ist dabei das Ausplattieren von frisch isolierten Hirndothelzellen auf Kollagen beschichteten permeablen Trägermaterialien. Als Träger eignet sich hierzu das Transwell[®], ein Zwei-Kammer-System (siehe Abbildung 4). Solche Systeme sind besonders für Transportuntersuchungen von luminaler nach abluminaler Seite geeignet. Es besteht die Möglichkeit Transwellkulturen als Co-Kultur mit Astrozyten anzulegen, um der natürlichen *in vivo* Situation möglichst nahe zu kommen (Janzer and Raff, 1987). Durch solche Co-Kultivierung wird die Ausbildung von spezifischen BHS-Eigenschaften wesentlich beeinflusst.

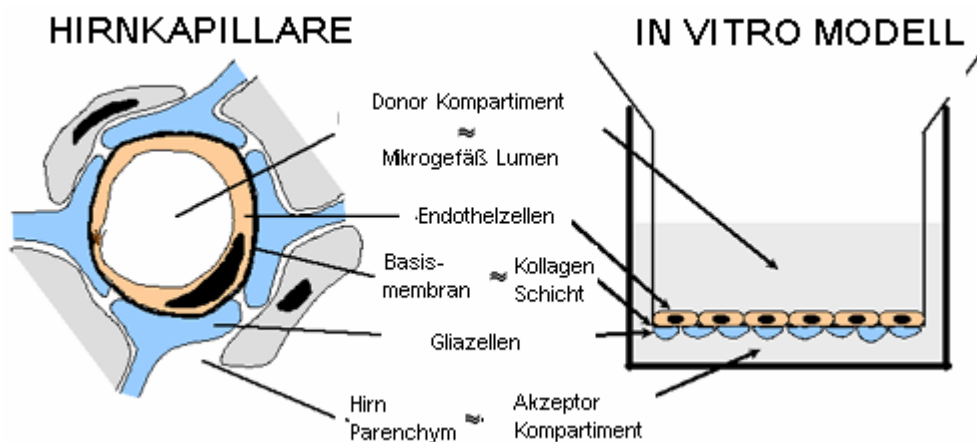


Abbildung 4 *in vitro* Transwellmodell[®],
aus <http://www.umu.se/pharm-neuro/pharmacology/forskning/BBB.html>

Um die Aufgabe als *in vitro* BHS-Modell zu erfüllen, werden an solche Systeme einige Anforderungen gestellt:

- Ausbildung eines homogenen Zellrasens
- Ausbildung von „tight junctions“
- Expression von BHS typischen Markern
- hoher transendothelialer elektrischer Widerstand (TEER)
- geringe Sucrosepermeabilität

Für die Zellkultur eignen sich neben den oben erwähnten frisch isolierten Zellen auch verschiedenste Zelllinien. Beide Zellartsysteme zeigen gewisse Vor- und Nachteile:

Primärkulturen haben gegenüber Zelllinien den Nachteil des hohen Aufwands bei Isolierung und Handhabung. Zelllinien wiederum verlieren oftmals durch das häufig Passagieren spezifische BHS-Eigenschaften. Eine Übersicht zu den verschiedenen *in vitro* Systemen befindet sich im Artikel von Reichel et al. (2003).

Die *in vitro* Systeme haben den Nachteil, dass ihre Ergebnisse mit denen von *in vivo* Modellen oft nicht korrelieren und daher die *in vitro* Daten nur eine Annäherung darstellen (Pardridge et al., 1990). Ein Vorteil ist dennoch, dass durch die *in vitro* Systeme viele Daten ohne unnötige Tierversuche erhoben werden können. So kann das Verhalten vieler möglicher Arzneistoffe im Bezug auf ihre Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit bereits im Vorfeld charakterisiert werden und die Zahl der noch notwendigen Versuche stark reduziert werden. Mit solchen *in vitro* Untersuchungen lassen sich Faktoren wie Geld und Zeit reduzieren, sowie die Zahl der Tierversuche verringern.

In vivo Versuche beruhen auf dem Nachweis des jeweilig zu untersuchenden Wirkstoffs im Gehirn. In den meisten der Experimente wird der Transport der Stoffe in Gehirnschnitten durch Farbreaktionen, Autoradiographie (Verdun et al., 1990) oder Hirnveränderungen (Wenisch et al., 1996) nachgewiesen. Hierzu muss das Versuchstier nach der Applikation der Testzubereitung getötet und sezziert werden. Um dynamische Untersuchungen am lebenden Objekt durchzuführen, greift man auf die Mikrodialyse zurück. Dabei können Stoffkonzentrationen in der Extrazellulärflüssigkeit des Gehirns gemessen werden (de Lange et al., 1999). Um *in vivo* Transportmechanismen zu untersuchen, besteht beispielsweise die Möglichkeit, den analgetischen Effekt von zentral pharmakologisch wirksamen, nicht hirngängigen Stoffen zu untersuchen. Hierbei wird ein möglicher Transport über die BHS bestimmt, indem die Schmerzempfindlichkeit eines Tieres vor und nach Applikation eines zentral wirksamen Analgetikums erfasst wird. Zur Bestimmung der Schmerzempfindlichkeit werden Testsysteme wie der „Hot Plate“- (van Eick, 1967) oder der „Tail-Flick“-Test (Isabel et al., 1981) eingesetzt.

2.1.5. Strategien zur Überwindung der BHS

Unspezifische osmotische Öffnung

Bei der unspezifischen Öffnung mittels hyperosmotischer Lösungen wie Mannitollösung wird die BHS zwar geöffnet, doch kann das Eintreten von Stoffen in das Gehirn nicht gezielt gesteuert werden. Im Wirkzeitraum der hyperosmotischen Lösung ist das Gehirn somit vor dem unkontrollierten Eindringen von Fremdstoffen nicht geschützt (Brown et al., 2004).

Chemische Modifikation der Wirkstoffe

Durch Veränderungen der Wirkstoffe ist es häufig möglich, diese für die BHS passierbar zu machen, beispielsweise durch Erhöhung der Lipophilie.

Invasive Eingriffe

Um Wirkstoffe in das Gehirn zu transportieren ist es möglich diese direkt intrakranial zu applizieren. Bei dieser Applikationsart besteht jedoch die relativ hohe Gefahr, dass beim Eindringen einer Kanüle in das Gehirn Gewebe wichtiger Hirnregionen zerstört wird.

Ausnutzen der bestehenden Transportmechanismen

Es besteht die Möglichkeit bereits bestehende Mechanismen beim Transport in das Gehirn zu verwenden, wie es beispielsweise bei der Therapie von Parkinson ausgenutzt wird. Hierbei wird L-Dopa als Dopamin Vorstufe über einen Aminosäuretransporter in das Gehirn transportiert.

2.2. „Drug Targeting“

2.2.1. Konzept des „Drug Targeting“

Für die meisten zugelassenen Wirkstoffe gilt, dass sich ihre Wirkung nicht auf den Ort der Erkrankung beschränkt. Solche Wirkstoffe verteilen sich nach ihrer Applikation abhängig von ihren physiko-chemischen und biochemischen Eigenschaften im Körper und verursachen dabei mehr oder weniger starke Nebenwirkungen, indem sie auch in Kompartimenten des Körpers wirken, die nicht von der zu behandelten Krankheit befallen sind. Zusätzlich wird durch die Verteilung des Wirkstoffs seine Anreicherung am Zielorgan beeinträchtigt. Damit wird eine Dosiserhöhung erforderlich, um ausreichende Wirkkonzentrationen am Wirkort zu erzielen. Das Konzept des gezielten

Wirkstofftransports durch Wirkstoffmodifikation und/oder Bindung an Trägersubstanzen wird als „Drug Targeting“ bezeichnet.

Allgemein lässt sich festhalten: „Drug Targeting“ ist die Möglichkeit einen Stoff selektiv, quantitativ und vorallem unabhängig von seiner Applikationsart am Zielort anzureichern (Torchilin, 2000).

Die ersten Ideen zu diesem Konzept stammen bereits von Paul Ehrlich. Mit den „magic bullets“ brachte dieser den Gedanken des „Drug Targeting“ zum Ausdruck. Dabei zeigte sich bereits die Vereinigung der drei Komponenten:

Wirkstoff

Targeting Rest (Ligand)

Trägersystem

Es war auch Paul Ehrlich, der mit John Newport Langley den Grundstein für die Rezeptor-Theorie legte. Ehrlich und Langley waren die ersten, die eine spezifische zelluläre Reaktion von Stoffen mit sogenannten aufnahmefähigen Substanzen postulierten. Rezeptoren sind Proteine die Hormone, Wachstumsfaktoren, Transportproteine, Viren und Toxine spezifisch binden und aufnehmen. Liganden solcher Rezeptoren eignen sich daher als Steuereinheit für das „Drug Targeting“ (Niendorf and Beisiegel, 1991).

2.2.2. Liganden für „Drug Targeting“-Anwendungen

Als „Drug Targeting“-Liganden eignen sich beispielsweise Proteine, wie Insulin (Zhang et al., 2002), Transferrin (Li et al., 2003) oder Lipoproteine (Lundberg et al., 1993) aber auch Antikörper wie OX26 (Olivier et al., 2002) oder HIRMAb (Coloma et al., 2000), die mit Rezeptoren auf Zelloberflächen interagieren und so eine Zellaufnahme vermitteln. Zu Lipoproteinen und ihrem Einsatz als „Drug Targeting“-Ligand siehe auch Kapitel 2.2.2.1. Im Hinblick auf ein „Drug Targeting“ wurden auch neben den oben erwähnten körpereigenen Stoffen magnetische Stoffe und ihr möglicher Einsatz bei der Tumorthherapie untersucht (Widder et al., 1983).

2.2.2.1. Lipoproteine

Lipoproteine im Serum sind Komplexe die Cholesterol vom Dünndarm in die Leber oder andere Gewebe transportieren. Diese Komplexe haben einen hydrophoben Kern aus Triglyceriden und/oder Cholesterol bzw. Cholesterolestern. Der Kern ist von Phospholipiden umgeben, welche Apolipoproteine enthalten. Lipoproteine werden in Chylomikronen, Very Low Density Lipoproteine (VLDL), Low Density Lipoproteine (LDL) oder High Density Lipoproteine (HDL) unterteilt (Dergunov, 2004). Solche Lipoproteine transportieren beispielsweise Lipide im vaskulären System. Auch der Transport durch Endothelzellen und in die Zellen des Gewebes erfolgt mit Hilfe der Lipoproteine. Das „Targeting“-Potential der Lipoproteine, das heißt ihr zielgerichtetes Erreichen spezifischer Strukturen, ist jeweils abhängig von Partikelgröße, Lipidgehalt und Apolipoproteinspezies, sowie von Lipoprotein-Rezeptoren die auf Zelloberflächen exprimiert werden. Diese Rezeptoren vermitteln und regulieren die Lipoproteinaufnahme über endozytotische Prozesse. Die Aufnahme durch diese Transporter erfolgt für die verschiedenen Lipoproteine schnell und spezifisch. Dabei werden von den Lipoprotein-Rezeptoren die verschiedenen Spezies der Apolipoproteine auf der Oberfläche der Lipoproteine erkannt und ermöglichen so eine selektive zelluläre Aufnahme (Niendorf et al., 1991, Kader and Pater, 2002). Eine Übersicht zu den verschiedenen Lipoproteinen und ihren jeweiligen Apolipoproteinspezies befindet sich in Tabelle 1.

Tabelle 1 Übersicht zu Lipoproteinpartikeln und ihren Apolipoproteinen

Klasse	Apolipoprotein (Apo)
VLDL	B; E; C
LDL	B
HDL	A; E ;C
IDL	B; E

Eine besondere Rolle in der Forschung und insbesondere in der Gehirnforschung spielt das Glycoprotein ApoE mit seinen Rezeptoren.

Apolipoprotein E ist ein 34 kDa Protein und wird als einziges Apolipoprotein lokal im Gehirn exprimiert (Croy et al., 2004). ApoE spielt im Gehirn eine wichtige Rolle für neurales Wachstum und neuronale Regeneration (Ribalta et al., 2003). Es existiert in drei Hauptisoformen, Apolipoprotein E2, E3 und E4. Die Isoformen E2 und E3 sind hauptsächlich in HDL inkorporiert, während E4 primär in VLDL lokalisiert ist. ApoE3 ist die häufigste Form unter den drei bisher bekannten Isoformen. Die drei Formen unterscheiden sich in den Positionen 112 und 158 in ihren Aminosäuren. ApoE3 besitzt an Position 112 Cystein und an 158 Arginin, ApoE2 hat an beiden Positionen Cystein, während ApoE4 an beiden Positionen Arginin aufweist (Beffert et al., 2004). Die drei Isoformen zeigen unterschiedlich starke Bindungsaffinitäten zu verschiedenen endozytierenden Oberflächenrezeptoren worauf im Abschnitt 2.2.2.2 näher eingegangen wird. Die Hauptaufgabe des ApoE ist der Rezeptor vermittelte Transport von Cholesterol in die Leber und damit die Modulation der Lipid- und Lipoprotein-Konzentration im Blut (Martel et al., 1997; Hoffmann et al., 2001; Ribalta et al., 2003). Weiterhin spielen die Isoformen des ApoE eine Rolle bei Erkrankungen wie Hypercholesterolämie und Alzheimer. So konnte in Untersuchungen festgestellt werden, dass homozygote Patienten für ApoE4 häufiger an Alzheimer erkranken als Heterozygote (Croy et al., 2004).

2.2.2.2. LDL-Rezeptor-Genfamilie

Zur Familie der LDL-Rezeptoren gehören der LDL-Rezeptor (LDLR), der VLDL Rezeptor (VLDLR), das LDL-Rezeptor-Related-Protein (LRP), der ApoE2 Rezeptor und der Megalin-Rezeptor. Im Gehirn werden folgende Rezeptoren exprimiert: Das LRP von reaktiven Astrocyten und Neuronen und der VLDLR von Microglia und pyramidalen Neuronen, der LDLR weist eine diffuse neurophile Verteilung auf (Page et al., 1998). Alle zur Familie der LDL-Rezeptoren gehörenden Rezeptoren zeigen ähnliche Strukturen, wie sie für die Rezeptor-vermittelte Endozytose (siehe Endozytose in Kapitel 2.1.3.) notwendig sind. Sie besitzen alle einen Membrananker, eine Liganden Bindungsdomäne und eine dem epidermalen Wachstumsfaktor homologe Domäne, welche für die pH-abhängige Freigabe des Liganden im Endosom notwendig ist. Außerdem weist das zytosolische Ende Motive auf, die die Internalisierung über Clathrin-coated Pits (siehe Kapitel 2.1.3.) regulieren (Nimpf and Schneider, 2000;

Nykjaer and Willnow, 2002). Der Prototyp der Familie ist der LDLR, welcher die Aufnahme von Cholesterol-reichen Lipoproteinen reguliert. Bei genetischen Defekten dieses Rezeptors kann kein Lipoprotein aus dem Blut aufgenommen werden, es kommt zur Akkumulation der LDL Partikel im Blut (Hypercholesterolämie).

Interaktionen zwischen endozytotischen Rezeptoren und ihren Liganden erfolgen meist nach dem „ein Schloss - ein Schlüssel“-Prinzip. Monospezifische Rezeptoren binden einen oder zumindest nur eine bestimmte Klasse von Liganden. Dieses Konzept gilt auch für den LDLR, während andere Mitglieder der LDL-Rezeptorenfamilie weniger exakt in ihrer Ligandenauswahl sind. Der LDLR bindet nur Partikel mit den Apolipoproteinen E und B-100. Bei den Rezeptoren LRP und Megalin dagegen handelt es sich um sogenannte Scavenger-Rezeptoren (Einfang-Rezeptoren) mit einer Vielzahl an möglichen Liganden (Nykjaer and Willnow, 2002). Die Spezifität der Ligandenerkennung durch Rezeptoren der LDL-Rezeptor-Genfamilie geht beim LDLR bis zur Unterscheidung der einzelnen Isoformen des ApoE. Der LDLR hat eine hohe Bindungsaffinität zu ApoE3 (100%), während die Bindungsaffinität der Isoform ApoE2 100mal niedriger liegt (Ribalta et al., 2003). Der LRP interagiert mit ApoE2 in β -VLDL deutlich effizienter als der LDLR (Dergunov, 2004). In der schlechten Bindung des ApoE2 an den LDLR liegt auch die Begründung für hohe Plasmalipidspiegel und die daraus folgende Hypercholesterolämie bei Patienten mit einem verstärktem Auftreten der Isoform ApoE2.

2.2.2.3. Zellaufnahme von Lipoproteinen über Rezeptoren

Die meisten tierischen Zellen nehmen den Hauptanteil an benötigtem Cholesterin über Rezeptor-vermittelte Endozytose auf. Das Cholesterin wird im Blut über Lipoproteine transportiert. Das hat zur Folge, dass Cholesterol verarbeitende Zellen Transmembran-Rezeptormoleküle für Lipoproteine an der Plasmamembran ausbilden. Die Rezeptoren diffundieren zunächst an die Membranoberfläche und lagern sich dort mit neu entstehenden „Clathrin-coated Pits“ (siehe Kapitel 2.1.3.) zusammen. Da sich die „coated Pits“ ständig von der Membran abschnüren und Vesikel bilden, werden Lipoprotein-Partikel, die an die LDL-Rezeptoren gebunden haben, sehr schnell ins Zellinnere befördert. Nach dem Entfernen der Clathrinhülle bringen die Vesikel ihren Inhalt zu den

frühen Endosomen, die nahe der Zellperipherie lokalisiert sind. Von dort wandern die Lipoproteine weiter zelleinwärts und gelangen über die späten Endosomen in die Lysosomen. Die Cholesterol-Ester aus den Lipoproteinen werden hydrolisiert und das freie Cholesterol steht der Zelle für Synthesen zur Verfügung (Niendorf and Willnow, 1991; Alberts et al., 1997).

2.3. Trägersysteme

2.3.1. Trägersysteme im Allgemeinen

Für Trägersysteme eignen sich lösliche Polymere oder Partikel kleiner 1 µm. Zu letzteren zählen Liposomen und Nanopartikel (NP) (Barratt, 2003). Solche Träger haben eine hohe Transportkapazität, verändern das Körperverteilungsmuster der Wirkstoffe und sind in der Lage die Nebenwirkungen der transportierten Wirkstoffe zu senken. Häufig besteht für diese Träger die Möglichkeit an der Partikeloberfläche Liganden für ein „Drug Targeting“ zu binden (siehe Kapitel 2.2.).

Bei der Bindung von löslichen Trägern wie [Hydroxypropyl]methacrylamid (HPMA) (Minko et al., 2001), Albumin (Dosio et al., 2001) oder Polyethylenglycol (Pechar et al., 2000) an Zytostatika konnte deutlich die Toxizität des Wirkstoffs gesenkt bzw. die anti-tumorale Wirkung verstärkt werden. Bei löslichen Trägern wie HPMA konnte gezeigt werden, dass sie ihre Wirkstoffe über säure- oder enzymspaltbare Linker kontrolliert freisetzen können (Kratz et al., 1999).

Liposomen wiederum bestehen aus einer oder mehreren Phospholipid-Doppelschichten die einen wässrigen Kern einschließen. Liposomen wurden das erste Mal 1971 als Träger für biologisch aktive Substanzen beschrieben (Gregoriadis et al., 1971). Wasserlösliche Substanzen können innerhalb des Kerns und lipophile Stoffe innerhalb der Doppelschichten angereichert werden.

2.3.2. Nanopartikel

NP sind feste kolloidale Partikel im Größenbereich von 1 bis 1000 nm, die aus verschiedenen Makromolekülen bestehen können. In die NP können Wirkstoffe eingeschlossen, verkapselt, gelöst oder an ihrer Oberfläche adsorbiert oder kovalent gebunden werden (Kreuter, 1983; Lockman et al., 2002). Die verschiedenen Ausgangsmaterialien und Herstellungsmethoden erlauben mit ihrer Vielzahl an Eigenschaften einen breitgestreuten Einsatz. Die meisten Trägersysteme bieten neben dem Wirkstofftransport die Möglichkeit eines „Drug Targeting“, welches über die Bindung von Liganden an der NP Oberfläche erreicht werden kann. Als Targeting-Struktur eignen sich Antikörper oder andere Rezeptor-Bindungsliganden, die einen zielgerichteten Transport bzw. eine spezifische zelluläre Aufnahme ermöglichen.

Solche modifizierten NP könnten als Wirkstofftransportsystem im menschlichen Körper eingesetzt werden.

2.3.2.1. Ausgangsmaterialien und Herstellungsverfahren

Die ersten NP wurden 1976 von Birrenbach und Speiser hergestellt (Birrenbach and Speiser, 1976). Diese ersten NP bestanden aus Polyacrylamid, es folgten im Laufe der Jahre zahlreiche Weiterentwicklungen mit Polyacrylaten und anderen Polymeren. Neben den synthetischen Makromolekülen wurden auch natürliche Materialien zur Nanopartikelherstellung eingesetzt (Allémann et al., 1993).

Tabelle 2 Übersicht über Ausgangsmaterialien und Methodik zur Herstellung von Nanopartikeln

Methode	Material	Literatur
Polymerisation	Polyacrylamid	Birrenbach and Speiser, 1976
	Poly(alkyl methacrylate)	Kreuter and Speiser, 1976
	Poly(alkyl cyanoacrylate)	Couvreux et al., 1982
	Polyglutaraldehyd	McLeod et al., 1988
Desolvatation	Albumin	Marty et al., 1978
	Gelatine	Marty et al., 1978
	Alginat	Rajaonarivony et al., 1993
Dispergierung	Poly(D,L-Milchsäure)	Gurny et al., 1981

Tabelle 2 zeigt einige beispielhafte Artikel zur Herstellung von NP. In der Übersicht wurden die jeweiligen Arbeiten in die Herstellungsmethoden Polymerisation, Desolvatation und Dispergierung eingeteilt. Für die verschiedenen Herstellungsmethoden lassen sich, wie aus der Tabelle zu entnehmen ist, unterschiedliche Ausgangsmaterialien einsetzen.

2.3.2.2. Eigenschaften und Verwendung

Kolloidale Trägersysteme aus natürlichem oder synthetischem Ausgangsmaterial weisen für ihre Anwendung als Trägersystem viele der Anforderungen eines „idealen Carriers“ auf. Dazu gehören u.a. eine einfache Herstellung und Handhabung, günstige Ausgangsmaterialien, problemlose Lagerung sowie eine mögliche Beladung mit Arzneistoffen. Außerdem sollte das Trägersystem untoxisch, biodegradierbar, nicht immunogen und nicht thrombogen sein (Lockman et al., 2002).

Einige kolloidale Trägersystem befinden sich bereits in der klinischen Anwendung, wie beispielsweise in der Diagnostik oder in der Tumorthherapie. In der Kontrast-Echocardiographie wird das Handelspräparat Optison® von Amersham Health eingesetzt. Dabei handelt es sich um Albumin-NP mit Perflutren zur besseren Darstellung der endocardialen Grenzen des Herzens. Für die Tumordiagnostik und die Tumorthherapie werden eisenoxidhaltige Nanoteilchen eingesetzt.

2.4. Systementwicklung zur Überwindung der BHS

Für die Idee der Entwicklung von ApoE gebundenen Albumin-NP, wie sie in dieser Arbeit beschrieben werden, waren eine Reihe von Untersuchungen im Vorfeld verantwortlich, bei denen sich die Möglichkeit des Transports von NP in das Gehirn mit Hilfe des Liganden Apolipoprotein herauskristallisierte.

2.4.1. Körperverteilungsstudien

Bei Körperverteilungsstudien wurde der Einfluss verschiedener Tenside auf der Oberfläche von ^{14}C -markierten PMMA-NP untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass nach intravenöser Applikation von Polysorbat 80-überzogenen NP eine reduzierte Leberakkumulation und eine verbesserte Hirngängigkeit erzielt werden kann. Es wurde angenommen, dass die veränderte Körperverteilung der radioaktiv markierten NP durch eine Interaktion der Polysorbat gecoateten NP mit Blutbestandteilen zustande kam (Tröster et al., 1990).

2.4.2. Zellaufnahmestudien

Auch in Zellstudien konnten ähnliche Resultate erzielt werden. Borchard et al. zeigten 1994 in Versuchen mit bovinen Hirnendothelzellen, dass tensidüberzogene NP besser aufgenommen werden als nicht überzogene Partikel (Borchard et al., 1994). Dabei war die Zellaufnahme in Bezug auf Menge und Geschwindigkeit von der Art und Konzentration des jeweiligen Tensids abhängig. Besonders Polysorbat 80-überzogene PMMA-NP zeigten im Vergleich zur Kontrolle eine um das 5-fache höhere Aufnahme in Endothelzellen.

2.4.3. Tierversuche

Auf Grundlage der Ergebnisse von Tröster et al. und Borchard et al. wurde 1995 und 1996 in Tierversuchen der Wirkstofftransport mit Polysorbat 80-überzogenen Polybutylcyanoacrylat-Nanopartikel (PBCA-NP) untersucht. Mit Hilfe des Tail-Flick-Tests konnte nach intravenöser Applikation von wirkstoffbeladenen tensidüberzogenen PBCA-NP ein analgetischer Effekt in Mäusen gezeigt werden. Als Wirkstoffe wurden Dalargin und Loperamid, zwei zentral pharmakologisch wirksame, aber nicht hirngängige Stoffe eingesetzt. Beide Versuche zeigten, dass im Vergleich zur reinen Wirkstofflösung und zu nicht überzogenen NP nur die tensidüberzogenen PBCA-NP einen Effekt hervorrufen konnten (Alyautdin et al., 1995; Alyautdin et al., 1997). Es stellte sich daher erneut die Frage, wie der Tensidüberzug die Partikel insoweit verändert, dass diese über die BHS in das Gehirn gelangen können.

2.4.4. Plasmaadsorptionsmuster

Um die Frage des Tensidüberzug-Einflusses zu klären, wurden Plasmaadsorptionsstudien mit Hilfe der 2D-Gel Elektrophorese durchgeführt. Hierzu untersuchte Lück (1997) nach einem etablierten Verfahren von Blunk die Adsorption von Plasmaproteinen an PBCA-NP (Blunk et al., 1993). In den resultierenden Adsorptionsmustern wurde auf den mit Polysorbat 80-überzogenen NP eine hohe Apolipoprotein E-Anlagerung detektiert. Aufgrund dieser Ergebnisse konnte angenommen werden, dass das an der Oberfläche adsorbierte ApoE mit der verbesserten Aufnahme in das Gehirn in Zusammenhang stehen könnte.

2.4.5. Apolipoprotein E als möglicher Schlüssel zur Überwindung der BHS

Es wäre somit aufgrund der bisherigen Untersuchungen denkbar, dass eine Adsorption des ApoE an der Oberfläche von NP zu einer rezeptorvermittelten Aufnahme der NP über Mitglieder der LDL-Rezeptorfamilie an der BHS führen könnte.

Aufgrund der bisherigen Daten wurde 2002 untersucht, welchen Einfluss eine Vorinkubation von NP mit verschiedenen Apolipoproteinen auf den Transport in das Gehirn hat (Kreuter et al., 2002). Die Vorinkubation von PBCA-NP mit ApoE und ApoB führte zu einer Erhöhung des Wirkstofftransports in das Gehirn, jedoch nicht in stärkerem Ausmaß als bei Polysorbat 80-überzogenen NP. Die Addition von Polysorbat-„Coating“ und ApoB (bzw. ApoJ oder ApoE)-„Coating“ führte zu besonders hohen Effekten.

Problematisch ist bei der adsorptiven Bindung von Apolipoproteinen an NP-Oberflächen jedoch die mögliche Desorption der Plasmaproteine von der Oberfläche. Daher war es Ziel dieser Arbeit, NP mit kovalent gebundenem Apolipoprotein zu entwickeln, zu charakterisieren und ihre Wirksamkeit zu testen.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Laborgeräte

Analysenwaage Supermicro S4	Sartorius
Brutschrank Cytoperm	Heraeus
CLSM:	
Imaris software	Bitplane
Leica Confocal Software (LCS)	Leica
Bildbearbeitungssoftware Lucia Version 3.0	Laboratory Imaging GmbH
Leica DM IRBE	Leica
LSM 510	Zeiss
FACSCalibur	Becton-Dickinson
FACScan Flow Cytometer	Becton-Dickinson
FluoStar Galaxy	BMG Labtechnologies
Gelscan 5.02 Software	BioSciTec
HPLC:	
Controller 600	Waters
Autosampler AS 100	tsp
Waters 486 Tunable Absorbance Detektor	Waters
Luna C18 (2) 250x4,6 mm	phenomenex
Nucleosil 10 μ C18 100Å 50x4,0 mm	phenomenex
Mini-Protean-II-Apparatur	Bio-RAD
Minizentrifuge Galaxy	VWR
pH-Meter 766 Calimatic	Knick
Spektralphotometer U-3000	Hitachi
Snapscan 1236 Scanner	Agfa
Trockenschrank	Ehert
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Ultraschallgerät RK 102 H	Bandelin Sonorex
Vortex Genie 2	Scientific Industry
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf
Zetasizer 3000 HSA	Malvern Instruments

3.1.2. Verbrauchsmaterialien

Chamber Slide Flasks	Nunc
Cover Slides Lap Tek II	Nunc
D-Salt® Dextran Desalting Säulen	Pierce
Gel-Blotting-Papier	Schleicher & Schüll
Protein Desalting Spin Column	Pierce
Protran® BA85, Nitrocellulose Membran	Schleicher & Schüll
Sterilfilter 0,2 µm	Schleicher & Schüll
UVette® 220 – 1600 nm	Eppendorf
3MM Filterpapier 3-lagig	Whatman
24-Well Platten	Nunc
96-Well Mikrotiterplatten	Greiner

3.1.3. Chemikalien und Reagenzien

Aceton p. a.	Merck
Ethanol reinst	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Caelo
Natriumchlorid	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
DiNatriumhydrogenphosphat	Merck
Triethanolamin (TEA)	Fluka
Polysorbat 80	ICI Chemicals

3.1.3.1. Nanopartikelherstellung

Glutaraldehyd 25%	Fluka
Humanes Serumalbumin (HSA), Fraktion V	Sigma

3.1.3.2. Nanopartikelmodifikation

2-Iminothiolan HCl (Trauts Reagenz)	Pierce
Maleinimidobenzoyl-N-hydroxysulfosuccinimid (sulfo-MBS)	Pierce/Molecular Biosciences
Maleinimidoundecanoyloxy-sulfosuccinimid (sulfo-KMUS)	Pierce
Sulfosuccinimidyl-maleinimidomethyl cyclohexan-carboxylat (sulfo-SMCC)	Pierce
Sulfosuccinimidyl-[maleinimidophenyl]butyrat (sulfo-SMPB)	Pierce
NHS-Polyethylenglycol 3400-Maleinimid (NHS-PEG-Mal)	Nektar
NeutrAvidin® (NAv)	Pierce
Avidin (Av)	Pierce/Molecular Probes
NHS-Biotin	Pierce
PFP-Biotin	Pierce
Apolipoprotein E (ApoE)	Calbiochem

3.1.3.3. Nanopartikelcharakterisierung

Micro Bicinchoninic acid protein kit (BCA)	Pierce
Biotin-4-fluorescein (B4F)	Molecular Probes
5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) (Ellmans Reagenz)	Pierce
L-Cystein HCl	Sigma
2,4,6-Trinitrobenzensulfonsäure (TNBS)	Sigma
4-Hydroxyazobenzen-2-Carbonsäure (Haba)	Sigma

3.1.3.4. Wirkstoffbeladung

Loperamid	Sigma
Microcon 10000	Amicon

3.1.3.5. Gelelektrophorese (SDS-Page)

Acrylamid Bisacrylamid 40% (29 / 1)	Sigma
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma
Anti-mouse IgG AK (goat) alkal. Phosphatase	Calbiochem
Anti-ApoE AK (goat)	Calbiochem
Anti-goat IgG AK (rabbit) alkal. Phosphatase	Calbiochem
Streptavidin alkal. Phosphatase Konjugat	Molecular Probes
5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat (BCIP)	AppliChem
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA-Laboratories
Bromphenolblau	AppliChem
Coomassie Brilliant Blue R250	AppliChem
N,N-Dimethylformamid	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO), 99,9%	Fluka
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
Glycerin 86%	Roth
Glycin für Elektrophorese	Merck
Magnesiumchlorid	Wasserfuhr
Molekulargewichtsmarker	BioLab
Aprotinin (6,5 kDa)	
Lysozyme (16,5 kDa)	
β -Lactoglobulin A (25 kDa)	
Triosephosphatisomerase (32,5 kDa)	
Aldolase (47,5 kDa)	
Glutamat-dehydrogenase (62 kDa)	
MBP-Paramyosin (83 kDa)	
MBP- β -galaktosidase (175 kDa)	
Nitroblue Tetrazolium (NBT)	AppliChem
Natriumdodecylsulfat (SDS) für Elektrophorese	AppliChem
Tetramethylendiamin (TEMED)	AppliChem
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS)	
Ultrapur 99,9%	AppliChem

3.1.3.6. Zellkultur

LDL-R (Ab-1) IgG (mouse) AK	Oncogene
Alexa® 594 ConA	Molecular Probes
BSA	Sigma
DMEM	Dulbecco
fötales Kälberserum (FCS)	Boehringer
Anti-mouse IgG (goat) AK	Caltag
Natriumazid	Merck
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich
Rhodamin ConA®	Molecular Probes
Trastuzumab (Herceptin®)	Hoffmann La Roche
Vectashield®	Vector

3.1.3.7. Zellen

Humane Leberzellen

Zelllinie Hep G2 ATCC

Die Oberflächenrezeptoren LDLR und LRP tragende Leberzellen (Beisiegel et al., 1989)

Immortalisierte Mäusehirnkapillar Endothelzellen

Zelllinie β .End3 ECACC

Zeigt typische Merkmale und Expressionsmuster der Hirnkapillar Endothelzellen (Omidi et al., 2003)

Adenokarzinom Zelllinien/Brustkrebszellen:

Zelllinie SK-Br-3 ATCC

Brustkrebszelllinie mit Überexpression des HER2-Proteins (Trempe, 1976)

Zelllinie MCF7 DSMZ

Besitzt Eigenschaften von differenzierten Mammaepithelzellen, einschließlich der Fähigkeit durch Estradiol über den zytoplasmatischen Rezeptor das Wachstum der Zellen zu fördern (Brooks et al., 1973)

Zelllinie BT474 DMSZ

Humane Adenokarzinom Brustkrebszelllinie mit einer Überexpression des HER2-Oberflächenproteins (Lasfargues et al., 1978)

3.1.4. Puffer und Lösungen

3.1.4.1. Nanopartikelmodifikation

Tris Puffer pH 8,5	Tris	6,056 g
	Natriumchlorid	8,768 g
	NaEDTA	0,372 g
	MQ	ad 1000 ml
PBS Puffer pH 7,0	Natriumdihydrogenphosphat H ₂ O	1,069 g
	DiNatriumhydrogenphosphat 2H ₂ O	2,158 g
	Natriumchlorid	8,766 g
	MQ	ad 1000 ml
PBS Puffer pH 7,0/EDTA	Natriumdihydrogenphosphat H ₂ O	1,069 g
	DiNatriumhydrogenphosphat 2H ₂ O	2,158 g
	Natriumchlorid	8,766 g
	NaEDTA	3,720 g
	MQ	ad 1000 ml
PBS Puffer pH 7,4/isoton	Natriumdihydrogenphosphat 2H ₂ O	1,36 g
	DiNatriumhydrogenphosphat 2H ₂ O	6,18 g
	Natriumchlorid	5,80 g
	MQ	ad 1000 ml
Puffer pH 7,5	Natriumdihydrogenphosphat H ₂ O	2,30 g
	DiNatriumhydrogenphosphat 2H ₂ O	16,80 g
	NaEDTA	3,72 g
	MQ	ad 1000 ml
Puffer pH 8,0	Natriumdihydrogenphosphat 2H ₂ O	0,20 g
	DiNatriumhydrogenphosphat 2H ₂ O	3,53 g
	MQ	ad 1000 ml

TEA Puffer pH 8,0	Triethanolamin	7,46 g
	Natriumchlorid	8,77 g
	NaEDTA	0,37 g
	MQ	ad 1000

Phosphat Puffer pH 7,5 für den B4F-Versuch

Natriumdihydrogenphosphat H ₂ O	6,89 g
Natriumchlorid	5,84 g
NaEDTA	0,37 g
MQ	ad 1000 ml

3.1.4.2. Gelelektrophorese (SDS-Page)

4x Lower Gel Puffer pH 8,8	Tris (1,5 M)	90,9 g
	SDS (0,4%)	2,0 g
	MQ	ad 500 ml

Lower Gel 7,5%	4x Lower Gel Puffer pH 8,8	0,87 ml
	Acrylamid Lösung	3,50 ml
	MQ	9,58 ml
	TEMED	5,0 µl
	APS (50 mg in 500 µl MQ)	50 µl

Lower Gel 15%	4x Lower Gel Puffer pH 8,8	0,87 ml
	Acrylamid Lösung	7,0 ml
	MQ	6,05 ml
	TEMED	5,0 µl
	APS (50 mg in 500 µl MQ)	50 µl

4x Upper Gel Puffer pH 6,8	Tris (0,5 M)	15,14 g
	SDS (0,4%)	2,0 g
	MQ	ad 250 ml

Material und Methoden

Upper Gel	4x Upper Gel Puffer pH 6,8	313 µl
	Acrylamid Lösung	500 µl
	MQ	4,138 ml
	TEMED	5,0 µl
	APS (50 mg in 500 µl MQ)	16 µl
10x SDS Laufpuffer pH 8,8	Glycin (1,9 M)	144 g
	Tris (0,25 M)	30,3 g
	SDS (1%)	10,0 g
	MQ	ad 1000 ml
4x Probenpuffer	4x Upper Gel Puffer pH 6,8	1,2 ml
	Glycerin 86%	3,0 ml
	SDS 10%	1,98 ml
	MQ	2,6 ml
	Bromphenolblau 1%	1,0 ml
Transferpuffer pH 8,3	Tris (25 mM)	3,03 g
	Glycin (192 M)	14,4 g
	Methanol 20%	200 ml
	MQ	ad 1000 ml
10x TBS Puffer	Tris (100 mM)	12,12 g
	SDS (1,5 M)	87,66 g
	MQ	ad 1000 ml
TTBS Puffer	10x TBS Puffer	100 ml
	Polysorbat 20	0,5 ml
	MQ	ad 1000 ml

Detektionspuffer pH 9,5	Tris	7,88 g
	Natriumchlorid	2,92 g
	Magnesiumchlorid	0,238 g
	MQ	ad 500 ml

Substratpuffer	NBT (50 mg/ml in DMF 70%)	330 µl
	BCIP (50 mg/ml in DMF)	170 µl
	Detektionspuffer pH 9,5	50 ml

Stopp Puffer	1x TBS Puffer	250 ml
	NaEDTA (0,5 M)	1,0 ml

3.1.4.3. HPLC Fließmittel

Fließmittel pH 3,8	Acetonitril	400 ml
	Natriumdihydrogenphosphat 2H ₂ O	1,872 g
	Diethylamin	2 ml
	MQ	ad 1000 ml

3.1.4.4. Zellkultur

FACS Puffer	BSA	3,0 g
	Natriumazid	0,5 g
	PBS (PAA, Cölbe)	ad 500 ml

3.2. Nanopartikelherstellung

Herstellungsmethode für proteinbasierte NP

Die Herstellung unbeladener NP basiert auf der von Weber et al. (2000a) beschriebenen modifizierten Desolvationsvorschrift, die in Anlehnung an die Methode von Marty et al. (1978) entwickelt wurde.

Dazu wurden 200 mg humanes Serumalbumin (HSA) in 2 ml Milli Q-Wasser (MQ) gelöst. Die 10%-ige Lösung wurde unter permanentem Rühren auf einer Magnetrührplatte (550 U/min) tropfenweise mit 8,0 ml Ethanol 96% versetzt. Die erhaltenen NP wurden anschließend durch die Zugabe von 235 µl Glutaraldehyd 8% (bezogen auf die 60 Aminogruppen pro HSA-Molekül entspricht dies 200%) quervernetzt und für 6 - 12 Std bei RT gerührt.

Die Aufreinigung der NP erfolgte durch Zentrifugieren der zuvor in 2 ml Ansätze aliquotierten Suspension bei 16000 g/10 min in einer Eppendorf Zentrifuge. Anschließend wurde der Überstand (Üb) abgenommen und das Pellet durch Behandlung im Ultraschallbad in dem gleichen Volumen MQ resuspendiert. Die Waschprozedur wurde viermal wiederholt. Die gewaschenen Ansätze wurden wieder vereinigt und bezüglich der Partikelgröße (siehe 3.3.2.) und des Gehalts (siehe 3.3.1.) charakterisiert.

3.3. Nanopartikelcharakterisierung

3.3.1. Gehaltsbestimmung

Der Gehalt der NP in der Suspension wurde gravimetrisch über den Trocknungsverlust bestimmt.

Dazu wurden 50,0 µl der entsprechenden Präparation in ein zuvor tariertes Aluminium-Wägschiffchen überführt und die Probe bei 100°C im Trockenschrank für 2 Std getrocknet. Die Schiffchen wurden nach Abkühlung erneut gewogen und die Massendifferenz ermittelt. Die Ausbeute wurde in mg/ml NP angegeben.

Die Werte wurden gegebenenfalls bei Zugabe von Salzzusätzen in den verwendeten Medien um den Salzfaktor korrigiert.

3.3.2. Partikelgröße

Die Partikelgröße und Partikelgrößenverteilung wurden unter Verwendung der Photonenkorrelationsspektroskopie (PCS), die auf dem Prinzip der dynamischen Laserlichtstreuung beruht, bestimmt. Die suspendierte Probe muss vor der Messung verdünnt werden, so dass sich die Partikel ungeordnet und zufällig nach der Brownschen Molekularbewegung bewegen können. Verdünnt wurde mit filtriertem MQ-Wasser (0,22 µm Filter), je nach Gehalt im Bereich 1 : 200 bis 1 : 1000. Anschließend wurden die Proben bei RT in geeigneten Einmalküvetten mit einem Laser bei 633 nm Wellenlänge im Zetasizer untersucht. Die Messung erfolgte im festen Winkel von 90°. Die Empfindlichkeit wurde automatisch über die Blendenöffnung des Geräts im Bereich von 0 - 200 µm festgelegt und reguliert, wodurch Schwankungen in der Partikelkonzentration ausgeglichen wurden.

3.3.3. Aminogruppenbestimmung auf der Oberfläche

Die Anzahl der freien Aminogruppen auf der Partikeloberfläche wurde durch Umsetzung mit TNBS und photometrischer Auswertung bestimmt. Ein Volumen von 100,0 µl der NP-Suspension wurde mit 300,0 µl MQ verdünnt und mit 400,0 µl einer 4%-igen NaHCO₃-Lösung pH 8,5 gepuffert, bevor 400,0 µl einer 0,2%-igen TNBS-Lösung zugesetzt wurden. Für die spätere Umrechnung der Absorption in Mol wurde eine Eichgerade für TNBS im Bereich von 0 bis 2,73e-6 mol mitgeführt. Dazu wurden 0, 100, 200, 300 und 400,0 µl der 0,2%-igen TNBS-Lösung zu 400,0 µl NaHCO₃-Lösung pipettiert und jeweils mit MQ auf 1,20 ml aufgefüllt. Die Ansätze wurden 2 Std bei 40°C im Thermomixer (500 rpm) inkubiert. Nicht verbrauchtes TNBS wurde in den Partikelüberständen nach erfolgter Zentrifugation (16000 g/10 min) photometrisch bestimmt. Dazu wurden 125,0 µl des Partikelüberstandes mit MQ auf 1,0 ml verdünnt und die Extinktion dieser Lösung bei 349 nm photometrisch vermessen.

3.4. Oberflächenmodifikationen

3.4.1. Avidin / NeutrAvidin[®]-modifizierte Nanopartikel

Die Herstellung von Avidin / NeutrAvidin[®]-modifizierten NP ist prinzipiell über zwei Wege möglich:

Konventions-Methode

Thiolierung der HSA-NP und Aktivierung der Avidinkomponente mit einem Crosslinker, anschließende Konjugation der beiden Komponenten.

Umkehr-Methode

Thiolierung der Avidinkomponente und Aktivierung der HSA-NP mit einem Crosslinker, anschließende Konjugation der beiden Komponenten

Im Folgenden werden beide Wege beschrieben.

3.4.1.1. Einführung von SH-Gruppen

3.4.1.1.1. Einführung von SH-Gruppen auf der Oberfläche von HSA-NP

Zur Einführung von Sulfhydrylgruppen wurden NP mit 2-Iminothiolan HCl behandelt.

Je 4 ml der NP-Suspension (20 mg/ml) wurden mit 1 ml einer 2-Iminothiolan HCl-Lösung (26 mg/ml in Tris Puffer pH 8,5) versetzt und auf 8 ml mit Tris Puffer ergänzt. Die Probe wurde unter Rühren (400 - 500 U/min) über Nacht inkubiert.

Die Abtrennung des überschüssigen Reagenz erfolgte wie zuvor in Kapitel 3.2 beschrieben durch 4-faches Waschen mittels Zentrifugieren und Redispergieren. Das erhaltene Pellet wurde nach der Abnahme des Überstandes in dem Ausgangsvolumen von 4 ml MQ im Ultraschallbad resuspendiert.

Die Bestimmung der Anzahl der eingeführten Sulfhydrylgruppen pro HSA-Molekül wurde wie in 3.4.1.2. beschrieben durchgeführt.

3.4.1.1.2. Einführung von SH-Gruppen in Avidin / NeutrAvidin®

Zur Einführung von Sulfhydrylgruppen wurden 10 mg Avidin / NeutrAvidin® und 1,14 mg 2-Iminothiolan HCl jeweils in 1,0 ml TEA Puffer pH 8,0 gelöst, vereinigt und über Nacht bei 20°C unter Schütteln (500 U/min) auf dem Thermomixer inkubiert. Zur Entfernung des überschüssigen Trauts Reagenz wurde eine Größenausschlusschromatographie mit einer 10 ml D-Salt® Dextran-Säule durchgeführt. Die Säule wurde nach Konditionierung mit TEA Puffer mit der halben Ansatzmenge (1,0 ml) beschickt und mit 1,0 ml Aliquoten TEA Puffer pH 8,0 eluiert. Der Vorgang wurde mit der zweiten Hälfte des Ansatzes wiederholt. Die aufgefangenen Fraktionen 1 - 8 beider Eluierungsvorgänge wurden photometrisch bei 280 nm auf ihren Proteingehalt hin untersucht. Die proteinhaltigen Fraktionen 5 und 6 wurden vereinigt und die in der Lösung verbliebene Avidin / NeutrAvidin®-Konzentration wurde gravimetrisch über den Trocknungsverlust (siehe 3.3.1.) unter Berücksichtigung der Puffersalze ermittelt.

Die Bestimmung der eingeführten Sulfhydrylgruppen pro mg Protein wurde wie in 3.4.1.2. beschrieben durchgeführt.

3.4.1.1.3. Einführung von SH-Gruppen in Apolipoprotein E

Für die kovalente Bindung von ApoE an HSA-NP wurden verschiedene Apolipoproteine eingesetzt.

Apolipoprotein E (Mischung aller Isoformen)	Calbiochem	Merck
Apolipoprotein E3	Hoffmann/Freiburg	
Apolipoprotein E2 Sendai	Hoffmann/Freiburg	
Apolipoprotein E2 Arg142Cys	Hoffmann/Freiburg	(Hoffmann et al., 2001)

Zur Einführung von Sulfhydrylgruppen wurden die ApoE-Proben zuvor in TEA Puffer pH 8,0 überführt. Das Umsalzen der 500 µg ApoE-Proben erfolgte über D-Salt® Dextran-Säulen (10 ml) und TEA Puffer nach dem Standardprotokoll des Herstellers, wie dies bereits in Kapitel 3.4.1.1.2. beschrieben wurde. Die verwendeten Säulen wurden vor der Probenaufgabe mit TEA Puffer pH 8,0 konditioniert, mit 1,0 ml einer 10 mg/ml HSA-Lösung abgesättigt und erneut mit TEA Puffer konditioniert. Für die Thiolierung wurde das entsprechende Volumen, welches jeweils 500 µg des ApoE enthielt, mit einer 2-Iminoethanol HCl-Lösung im 50-fachen Überschuss umgesetzt. Nach 24 Std Inkubation unter Rühren bei RT wurde das thiolierte ApoE von niedermolekularen Stoffen abgetrennt. Die Aufreinigung erfolgte über die bereits zuvor verwendeten 10 ml D-Salt® Dextran-Säulen. Die Säulen wurden je nach Ansatzmenge mit entsprechenden Volumina beschickt und mit 1,0 ml Aliquoten TEA Puffer eluiert. Die aufgefangenen Fraktionen 1 - 8 wurden jeweils photometrisch bei 280 nm auf ihren ApoE Gehalt hin untersucht. Die ligandenhaltigen Fraktionen wurden vereinigt (Fraktion 5 und 6). Ein Aliquot des thiolierten ApoE wurde für eine spätere Quantifizierung im WB aufbewahrt (siehe 3.4.1.6.5.).

3.4.1.2. Quantitative Bestimmung reaktiver Sulfhydrylgruppen an der Partikeloberfläche bzw. am Protein

Die Erfassung von Sulfhydrylgruppen erfolgte durch die Umsetzung mit Ellmans Reagenz, welches mit freien SH-Gruppen quantitativ zu einem photometrisch detektierbaren, farbigen Produkt umgesetzt wurde.

Je nach der zu erwartenden Sulfhydrylgruppen-Konzentration wurden die Präparationen unterschiedlich behandelt. Die HSA-NP-Proben wurden 1 : 10 in PBS pH 7,5 verdünnt, wohingegen thioliertes Avidin / NeutrAvidin® unverdünnt eingesetzt wurde. Von der jeweiligen thiolierten Probe wurden 150,0 µl mit 1315,0 µl PBS pH 7,5 versetzt und mit Ellmans Reagenz (4 mg/ml) auf 1,50 ml ergänzt. Als Eichgerade diente eine frisch hergestellte L-Cystein-Lösung (2 mg/ml), die unterschiedlich stark verdünnt wurde. Der Konzentrationsbereich der Eichgerade entsprach $1,139 \times 10^{-7}$ mol/ml bis $1,139 \times 10^{-6}$ mol/ml Cystein. Je 150,0 µl der Proben der Konzentrationsreihe wurden jeweils mit der gleiche Reagenzmenge versetzt wie die oben beschriebenen thiolierten Proben, anschließend wurden diese ebenfalls mit Puffer auf 1,50 ml aufgefüllt.

Nach einer Reaktionszeit von 15 min bei 25°C wurden die Überstände der zentrifugierten (20000 g/25 min) Proben photometrisch bei 412 nm in Quarz-Halbmikroküvetten gegen PBS pH 7,5 vermessen und die Konzentration der SH-Gruppen in der thiolierten Probe über die Eichgerade ermittelt.

3.4.1.3. Proteinaktivierung mit bifunktionalen Crosslinkern

In den folgenden Kapiteln werden Schritte zur Herstellung Avidin-gekoppelter HSA-NP beschrieben. Die Kopplung von Avidinkomponente und Partikeln erfolgt über zwei unterschiedliche Wege, der Hintergrund hierzu wird in Kapitel 4.2.1 erläutert.

3.4.1.3.1. Aktivierung von Avidin / NeutrAvidin®

Für die Umsetzung wurden 10 mg Avidin / NeutrAvidin® in 800 µl MQ gelöst, mit PBS Puffer pH 7,0 auf 1,6 ml aufgefüllt und anschließend mit 400 µl Crosslinker-Lösung (durchschnittlich $1,8 \times 10^{-5}$ mol/ml in PBS Puffer pH 7,0) versetzt. Die verwendeten Konzentrationen der Crosslinker-Lösungen sind der Tabelle 3 zu entnehmen. Nach einer Inkubationszeit von 60,0 min bei 20°C wurde der überschüssige Crosslinker durch Größenausschlusschromatographie

mit einer 10 ml D-Salt[®] Dextran-Säule von der aktivierten Proteinfraction abgetrennt. Ein Volumen von 1,0 ml des Ansatzes wurde auf die Säule aufgegeben und mit 1,0 ml Aliquoten PBS Puffer pH 7,0 eluiert. Der Vorgang wurde mit dem zweiten Milliliter wiederholt. Die aufgefangenen Fraktionen 1 - 8 beider Eluierungsdurchgänge wurden photometrisch bei 280 nm auf ihren Proteingehalt hin untersucht. Die proteinhaltigen Fraktionen 5 und 6 wurden vereinigt und die in der Lösung verbliebene Avidin / NeutrAvidin[®]-Konzentration wurde gravimetrisch über den Trocknungsverlust (siehe 3.3.1.) unter Berücksichtigung der Puffersalze bestimmt.

Tabelle 3 Eingesetzte Crosslinker-Lösung zur Aktivierung von Av / NAv

Crosslinker	MG [Da]	Konzentration	
		[mg/ml]	[mol/ml]
sulfo-MBS	416,3	8	1,92e-5
sulfo-KMUS	448,4	8	1,78e-5
sulfo-SMPB	458,4	8	1,74e-5
sulfo-SMCC	436,4	8	1,83e-5
NHS-PEG-Mal	3491	60	1,72e-5

3.4.1.3.2. Aktivierung von HSA-NP

Für die Umsetzung wurden 4,0 ml HSA-NP in PBS Puffer pH 8,0 (20 mg/ml) mit 1,0 ml Crosslinker-Lösung (durchschnittlich 1,8e-5 mol/ml in PBS Puffer pH 8,0) versetzt. Die genauen Konzentrationen der eingesetzten Crosslinker-Lösungen sind in Tabelle 4 aufgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 60,0 min bei 20°C wurde der überschüssige Crosslinker durch dreifaches Zentrifugieren (16000 g/8 min) und Redispergieren entfernt. Im letzten Aufreinigungsschritt wurden die Partikel auf das Ausgangsvolumen von 4,0 ml in MQ resuspendiert. Die NP wurden weiterhin bezüglich der Partikelgröße (siehe 3.3.2.) und des Gehalts (siehe 3.3.1.) charakterisiert.

Tabelle 4 Eingesetzte Crosslinker-Lösung zur Aktivierung von NP

Crosslinker	MG [Da]	Konzentration	
		[mg/ml]	[mol/ml]
sulfo-MBS	416,3	8	1,92e-5
NHS-PEG-Mal	3491	60	1,72e-5

3.4.1.4. Konjugation der aktivierten bzw. thiolierten Proteinkomponenten

3.4.1.4.1. Konjugation des aktivierten Avidins / NeutrAvidins[®] an thiolierte NP

Die aktivierte Proteinlösung wurde zu gleichen Teilen mit der NP-Suspension (je 1,0 ml) gemischt. Als Kontrollen dienten zum einen thiolierte NP ohne Zusatz von aktiviertem Protein und aktivierte Proteinlösung (100%-Wert) selbst, die beide im Verhältnis 1 : 1 mit MQ verdünnt wurden. Zum anderen wurden zur Kontrolle zwei Proben nicht thiolierter NP mit aktiviertem Protein bzw. MQ im Verhältnis 1 : 1 verdünnt, um den Grad der unspezifischen Bindung zu bestimmen. Die 5 Proben wurden für eine Stunde bei RT inkubiert. Die bei der Aufreinigung der nanopartikelhaltigen Proben durch dreimaliges Zentrifugieren (16000 g/8 min) anfallenden Üb wurden zur Bestimmung der Bindungsrate photometrisch bei 280 nm vermessen.

Vor der Bestimmung des freien ungebundenen Avidins / NeutrAvidins[®] im Üb wurden die Üb nochmals bei 20000 g/25 min zentrifugiert. Die verdünnte aktivierte Proteinlösung diente als 100%-Wert.

Die NP wurden weiterhin bezüglich der Partikelgröße (siehe 3.3.2.) und des Gehalts (siehe 3.3.1.) charakterisiert.

3.4.1.4.2. Konjugation der aktivierten NP an thioliertes Avidin / NeutrAvidin[®]

Für die Herstellung der Avidin / NeutrAvidin[®]-modifizierten NP wurden aktivierte HSA-NP (1,0 ml) zu gleichen Teilen mit thioliertem Avidin / NeutrAvidin[®] gemischt. Als Kontrollen dienten zum einen aktivierte NP ohne Proteinzusatz und reine thiolierte Proteinlösung (100%-Wert), die beide im Verhältnis 1 : 1 mit MQ verdünnt wurden. Zum anderen wurden zwei Proben mit nicht aktivierten

NP mit thiolisiertem Protein bzw. MQ im Verhältnis 1 : 1 verdünnt, um den Grad der unspezifischen Bindung zu bestimmen. Die 5 Proben wurden über Nacht bei RT inkubiert. Die bei der Aufreinigung durch dreimaliges Zentrifugieren (16000 g/8 min) anfallenden ÜB der nanopartikelhaltigen Proben wurden zur Bestimmung der Bindungsrate photometrisch bei 280 nm vermessen.

Vor der Bestimmung des freien und ungebundenen thiolierten Avidins bzw. NeutrAvidins® im ÜB wurden die Proben nochmals bei 20000 g/25 min zentrifugiert.

Die NP wurden weiterhin bezüglich der Partikelgröße (siehe 3.3.2.) und des Gehalts (siehe 3.3.1.) charakterisiert.

3.4.1.4.3. Konjugation der aktivierten NP an thioliertes ApoE

Ein Aliquot der mit PEG-Crosslinker aktivierten HSA-NP (25 mg) wurde mit 500 µg thioliertem ApoE umgesetzt und über Nacht bei RT unter Schütteln (600 rpm) inkubiert. Nach erfolgter Konjugation wurden die ApoE-PEG-NP abzentrifugiert und in MQ oder für die spätere Loperamidbeladung direkt in einem Ethanol-Wasser-Gemisch (0,7 : 1) resuspendiert. Die fertige Zubereitung wurde auf 10 mg/ml NP eingestellt. Der erhaltene Überstand der Zentrifugation wurde für eine Bestimmung des ungebundenen ApoE-Anteils mittels WB aufbewahrt (siehe 3.4.1.6.5.).

3.4.1.5. Funktionalitätsbestimmung des eingeführten Avidins / NeutrAvidins®

Die Funktionalität und die Zugänglichkeit der Biotinbindungsstellen des Proteins nach der Aktivierung und Kopplung an die Partikeloberfläche wurden mit einem fluoreszenzmarkierten Biotinliganden nachgewiesen (Gruber et al., 1998; Kada et al., 1999a; Kada et al., 1999).

Durchgeführt wurde die Prüfung in 96-Well-Mikrotiterplatten aus Polystyrol, die zuvor mit 250 µl einer 0,2%-igen HSA-Lösung im Kühlschrank vorbehandelt wurden. Nach 5-tägiger Inkubation wurde die HSA-Lösung entfernt und die Wells mehrfach mit MQ gewaschen. Das Nachweisreagenz Biotin-4-Fluorescein (B4F) wurde als Stammlösung in einer Konzentration von ~400 µM in DMSO gelöst (Lagertemperatur: -25°C). Vor dem Gebrauch wurde

die Stammlösung 1 : 20 mit B4F Puffer pH 7,5 verdünnt und die tatsächliche Konzentration wurde durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 495 nm unter Einbeziehung des molaren Extinktionskoeffizienten ($68000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), berechnet. Für die spätere Titrationslösung wurde die B4F-Lösung schließlich auf 400 nM verdünnt.

Die zu untersuchende NP-Präparation wurde auf Basis der photometrischen Messergebnisse (siehe 3.4.1.4.1. und 3.4.1.4.2.) auf einen Gehalt von etwa 20 nM Av / NAv mit B4F Puffer pH 7,5 eingestellt. Für die nicht kumulative Titration wurden je 150,0 μl der NP-Suspension in einer mit HSA vorbehandelten 96-Well Mikrotiterplatte mit Aliquoten von 0 – 40,0 μl B4F-Lösung versetzt und mit Puffer auf ein Volumen von 200,0 μl aufgefüllt. Nach dem Auffüllen lag die B4F-Konzentration in den Wells bei 4 – 80 nM. Die Platte wurde 3 Std im Dunkeln bei RT inkubiert, bevor das fluoreszenzmarkierte Biotinderivat bei einer Wellenlänge von 485 nm angeregt und das emittierte Licht bei 520 nm mit dem Fluostar Galaxy vermessen wurde (Balthasar et al., 2005).

3.4.1.6. Bindung von Liganden über das NeutrAvidin® / Biotin-System

3.4.1.6.1. Biotinylierung von Liganden

3.4.1.6.1.1. Biotinylierung von ApoE

Vor der Biotinylierungsreaktion wurden 500 μg ApoE (0,5 mg/ml in Ammoniumhydrogencarbonatpuffer) über Spin Columns nach dem Standardprotokoll des Herstellers umgesalzen und in PBS Puffer pH 7,0 überführt. Für die Biotinylierung wurden 0,1 mg PFP-Biotin in 24 μl DMSO gelöst und mit den 500 μg des umgesalzene ApoE 2 Std bei 10°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde nicht umgesetztes Biotin über eine 5 ml D-Salt®-Säule abgetrennt. Die einzelnen Fraktionen wurden mit je 500 μl PBS pH 7,0 eluiert und im Anschluss daran im Photometer bei 280 nm auf ihren Lipoproteingehalt hin untersucht. Die proteinhaltigen Fraktionen (Fraktion 4 - 6) wurden vereinigt. Mit einem Aliquot der Probe wurde später der Nachweis der erfolgten Biotinylierung im Western Blot (WB) durchgeführt (siehe 3.4.1.6.2.1.).

3.4.1.6.1.2. Biotinylierung von anti-HER2-Antikörpern

Für die Biotinylierung des anti-HER2-Antikörpers Herceptin® wurde ein ähnliches Standardverfahren angewendet wie bei der Biotinylierung des ApoE. Eine Antikörperlösung mit einer Konzentration von 1 mg/ml wurde in PBS pH 7,0 hergestellt. Anschließend wurde NHS-Biotin (1 mg/ml in DMSO) in einem molaren Reaktionsverhältnis von 5 : 1 zu der Antikörperlösung (MW 150 kDa) zugegeben. Die Inkubation erfolgte für 30 min unter ständigem Rühren bei Raumtemperatur. Der biotinylierte Antikörper wurde nach der Reaktionszeit von niedermolekularen Stoffen über eine D-Salt®-Säule getrennt. Die Fraktionen wurden photometrisch auf enthaltene Antikörper hin untersucht und entsprechend vereinigt. Der Proteingehalt in der biotinylierten Antikörperlösung wurde mit einem Standard BCA-Assay nach Protokoll des Herstellers ermittelt und der Biotinylierungsgrad mittels eines kolorimetrischen HABA-Assays bestimmt.

3.4.1.6.2. Quantifizierung des Biotinylierungsgrades

3.4.1.6.2.1. Western Blot zur semiquantitativen Bestimmung des Biotinylierungsgrades von ApoE

Die Kontrolle zur Biotinylierung des Apolipoprotein E erfolgte mit Hilfe von Gelelektrophorese und anschließendem WB. Siehe hierzu auch Kapitel 3.4.1.6.4 mit der genauen Durchführungsbeschreibung. Die Vorbereitungen und die Durchführung für die Elektrophorese entsprechen dem in Kapitel 3.4.1.6.4. beschriebenen Verfahren. Es wurde dabei ein 15% Lower Gel verwendet. Aufgetragen wurden jeweils 15 µl pro Tasche einer 1 : 1 verdünnten ApoE-Biotin-Probe, direkt nach Biotinylierung und Aufreinigung, so wie der unverdünnte erste und zweite Üb des ApoE-Biotins nach Inkubation mit NeutrAvidin®-modifizierten NP (siehe Kapitel 3.4.1.6.3.1.). Vor der Beladung der Geltaschen wurden die Proben mit Probenpuffer im Verhältnis 1 : 4 versetzt. Zusätzlich wurde ein Größenmarker auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese und das anschließende Blotten erfolgten wie in Kapitel 3.4.1.6.4. beschrieben. Für die Detektion des Biotins auf der Nitrocellulosemembran wurde eine Lösung des Konjugats Streptavidin-alkalische Phosphatase (1,0 µg/ml) verwendet.

3.4.1.6.2.2. HABA-Assay zur Bestimmung des Biotinylierungsgrades von Antikörpern

Für die Biotinylierungsbestimmung mittels HABA-Assay wurden 3 Proben angesetzt: Zu der Analysenprobe mit 50,0 µl biotinylierter Antikörperlösung, der Leerprobe mit 50,0 µl PBS pH 7,0 und der Kontrolle mit 50,0 µl Biotinlösung (14,6 µM in PBS pH 7,0) wurden je 50,0 µl Avidin-HABA-Lösung mit 300 µM HABA und 7,5 µM Avidin in PBS pH 7,0 gegeben. Anschließend wurden die drei Lösungen bei 500 nm photometrisch vermessen.

3.4.1.6.3. Bindung von biotinylierten Liganden an NeutrAvidin®-modifizierte Nanopartikel

3.4.1.6.3.1. Biotin-ApoE-Bindung

Für die Herstellung der ApoE-gekoppelten NeutrAvidin®-modifizierten NP wurden 20 mg NeutrAvidin®-modifizierte NP mit 160 µg biotinyliertem ApoE in 2 ml MQ suspendiert und für 12 Std inkubiert. Als NeutrAvidin®-modifizierte NP wurden NP verwendet, die mit PEG-Crosslinker nach der Umkehr-Methode hergestellt wurden. Zur Bestimmung der gebundenen ApoE-Konzentration wurden die NP gewaschen und die erhaltenen Überstände im WB untersucht. Für die Tierversuche wurden die ApoE-gekoppelten NP nicht mehr aufgereinigt.

3.4.1.6.3.2. Biotin-anti-HER2-Antikörper Bindung

Für die Herstellung der anti-HER2-Antikörper-gekoppelten NeutrAvidin®-modifizierten NP wurden 400 µl NeutrAvidin®-modifizierte HSA-NP (10 mg) mit 140 µl biotinyliertem anti-HER2-Antikörper (50 µg) für 12 Std inkubiert. Als NeutrAvidin®-modifizierte NP wurden NP verwendet, die mit PEG-Crosslinker nach der Umkehr-Methode hergestellt wurden. Anschließend wurden die NP gewaschen und die erhaltenen Überstände im WB auf die ungebundene Antikörperkonzentration hin bestimmt. Für die Zellkulturversuche wurden die aufgereinigten NP-Proben verwendet.

3.4.1.6.4. Bestimmung der Biotin-Liganden Bindung an das NP-System mittels SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-Page) und Western Blot

Allgemein beruht die SDS-Page-Methode (Laemmli, 1970) vorrangig auf der Proteinseparation unterschiedlicher Molekulargewichte durch Elektrophorese. Beim anschließenden WB werden die durch SDS-Page aufgetrennten Proteine bzw. Antikörper durch Anlegen von Strom auf eine Nitrocellulosemembran (Towbin et al., 1979) nach der „Wet Blotting“ Methode übertragen. Zur Immunanfärbung werden die erhaltenen Membranen gängigerweise mit einer Erst- und Zweit-Antikörperlösung inkubiert bzw. nur mit einer Zweit-Antikörperlösung, wobei der Zweit-Antikörper mit alkalischer Phosphatase-gekoppelt sein kann, um die spätere Detektion der Banden zu ermöglichen. Die Sichtbarmachung der Banden kann dann über eine enzymatisch katalysierte Reaktion erfolgen, durch die ein gefärbtes Produkt entsteht.

Für die Quantifizierung der Liganden ApoE und anti-HER2-Antikörper wurden zwei Lower Gele (Trenngele) [Apolipoprotein E: 15% Lower Gel bzw. anti-HER2-Antikörper: 7% Lower Gel] in einer Sandwichhalterung einer Mini-Bio-Rad-Apparatur gegossen. Sie wurden mit etwas Isopropylalkohol gegen das Austrocknen überschichtet, der nach Beendigung des Polymerisationsvorgangs, eine Stunde später, mit einem Filterpapier abgezogen wurde. Diese Gele wurden mit dem Upper Gel (Sammelgel) überschichtet. Durch vorsichtiges Einführen eines Teflonkammes wurden die Taschen zur späteren Probenaufnahme ausgeformt. Nach 45 min war der Polymerisationvorgang beendet, der Kamm wurde entfernt und die Gele in eine Mini-Protean-II-Laufkammer überführt, die mit SDS Laufpuffer befüllt wurde.

Die Überstände der Liganden-modifizierten NP wurden vor der Aufbereitung nochmals bei 20000 g/25 min lang zentrifugiert. Vor dem Auftragen wurden die ApoE Üb 1 : 4, die ApoE-Biotin-Probe vor NP Inkubation 1 : 8 verdünnt, alle ApoE-haltigen Proben wurden so auf eine theoretische Maximalkonzentration an ApoE von 20 µg/ml verdünnt. Die anti-HER2-Antikörper Üb wurden unverdünnt aufgetragen. Die Proben wurden nach der Verdünnung mit Probenpuffer versetzt (40 µl Probe mit 10 µl Probenpuffer). Es wurden jeweils 15 µl pro Tasche mit Gel-Loadingspitzen auf die Gele aufgebracht. Für die Quantifizierung wurde eine Eichgerade von 5 - 20 µg/ml ApoE bzw. 2 - 10 µg/ml anti-HER2-Antikörper mit Probenpuffer versetzt und wie bei den Proben wurden je 15 µl der Verdünnungen auf das Gel aufgetragen. Als Größenstandard wurde

ein angefärbter Molekulargewichtsmarker verwendet, der vor seiner Verwendung 5 min bei 95°C denaturiert wurde. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 35 mA über ca. 60 min durchgeführt, bis die Laufront am unteren Gelrand angekommen war.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung erfolgte der Transfer vom Gel auf eine Nitrocellulosemembran. Dazu wurde eine Kassette mit Gel und Nitrocellulosemembran in eine mit Transfer Puffer gefüllte Tankapparatur gehängt, die bei einer konstanten Stromstärke von 300 mA über 90 min laufen gelassen wurde. Die entstehende Wärme wurde über ein Wasserkühlsystem abgeführt.

Nach Waschen mit 1x TBS Puffer (10 min) wurden die Membranen 1 Std mit BSA-Lösung 2% in TTBS Puffer eingelegt. Nach mehrmaligem Waschen mit 1x TBS Puffer wurde die Membran der ApoE-Proben mit 25 ml der Erst-Antikörperlösung (anti-ApoE (goat) Ak; 92 mg/ml), in einer Verdünnung von 1 : 2000 in TTBS, eine Stunde lang inkubiert. Im Anschluß daran wurde erneut gewaschen und mit einer Zweit-Antikörperlösung (anti-goat IgG (rabbit) Antikörperkonjugat der alkalischen Phosphatase; 500 µg/ml) in einer Verdünnung 1 : 5000 für eine weitere Stunde inkubiert. Die Membran des anti-HER2 Blots wurde mit einem anti-mouse IgG (goat)-Antikörperkonjugat der alkalischen Phosphatase (500 µg/ml) für 1 Std inkubiert [25 ml einer 1: 5000 Verdünnung]. Nach den Antikörperinkubationen wurden beide Membranen erneut zweimal in 1x TBS-, einmal in 1x TTBS und einmal in Detektionspuffer für jeweils 10 min gewaschen. Abschließend wurden die Banden mit Substratpuffer in einem Zeitraum von 1 - 10 min visualisiert und die Reaktion durch Stopp Puffer abgebrochen.

Das Resultat wurde gescannt und die Membranen in MQ bei 4°C gelagert.

3.4.1.6.5. Bestimmung der kovalenten Bindung von ApoE an aktivierte HSA-NP

Die Kontrolle der Bindung des ApoE an HSA-NP erfolgte mit Hilfe von Gelelektrophorese und anschließendem WB. Es wurde ein 15% Lower Gel verwendet. Aufgetragen wurden jeweils 15 µl pro Tasche der auf 20 µg/ml verdünnten ApoE-Proben vor und nach erfolgter Thiolierung sowie der auf

20 µg/ml verdünnten ApoE-PEG-NP Überstände nach Inkubation von thiolisiertem ApoE mit aktivierten HSA-NP. Als Kontrolle wurde eine Eichgerade des ApoE (Calbiochem) im Konzentrationsbereich 5, 10 und 20 µg/ml mitgeführt. Vor der Beladung der Geltaschen wurden die Proben mit Probenpuffer im Verhältnis 1 : 4 versetzt. Zusätzlich wurde ein Größenmarker mit auf das Gel aufgetragen. Gelelektrophorese und WB erfolgten analog der Durchführungsbeschreibung in Kapitel 3.4.1.6.4. Für die Detektion des ApoE wurde die Nitrocellulosemembran mit einer Lösung eines Erst-Antikörpers (anti-ApoE (goat) 92 mg/ml) in einer Verdünnung 1 : 2000 und anschließend mit einer Zweit-Antikörperlösung eines Konjugats von anti-goat IgG (rabbit) und alkalischer Phosphatase in einer Konzentration von 0,1 µg/ml inkubiert. Zum Schluss wurden die Banden mit Substratpuffer visualisiert und eingescannt.

3.4.2. Loperamid

Das als Antidiarrhoikum eingesetzte Opioid 4-[4-(4-Chlorophenyl)-4-hydroxypiperidino]-*N,N*-dimethyl-2,2-diphenylbutyramid Hydrochlorid hat ein MG von 513,5 Da und ist bei physiologischem pH Werten in Wasser praktisch unlöslich. In Chloroform, Isopropanol, Methanol ist Loperamid leicht löslich und in Ethanol löslich.

3.4.2.1. Loperamid Beladung

Für die Beladung der NP wurden 20 mg der Partikel mit 6,6 mg bzw. 3,3 mg Loperamid in 1,4 ml Ethanol-Wasser Gemisch (0,7 : 1) für 2 Std bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Loperamid-beladenen NP abzentrifugiert und der Überstand auf den Gehalt an ungebundenem Loperamid mittels HPLC untersucht. Im Fall der ApoE-Biotin / NeutrAvidin[®]-modifizierten NP wurden für die Beladung NeutrAvidin[®]-modifizierte NP mit dem Wirkstoff inkubiert, der ungebundene Loperamid Anteil abzentrifugiert und die Loperamid-beladenen NP mit Biotin-ApoE-Lösung resuspendiert. Für die Loperamid Beladung der NP mit kovalent gebundenem ApoE wurden die fertigen ApoE-PEG-NP mit Wirkstoff inkubiert, der ungebundene Loperamid Anteil abzentrifugiert und die wirkstoffbeladenen NP anschließend in 2,0 ml MQ resuspendiert.

3.4.2.2. Loperamid Analytik

Für die Analytik wurde eine HPLC Methode nach Chen et al. (2000) verwendet. Eingesetzt wurde eine 5 µm Luna C18(2) Säule mit den Maßen 250 x 4,6 mm. Das Fließmittel bestand aus Acetonitril, 20 mM Natriumhydrogenphosphat Puffer und Diethylamin im Verhältnis 40 : 60 : 0,08 mit einem pH Wert von 3 - 4 und wurde mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min isokratisch gefördert. Die Detektion des Loperamids erfolgte bei 195 nm. Loperamid wurde bei diesen Bedingungen im Konzentrationsbereich von 0 - 10 µg/ml bestimmt.

3.4.2.3. Beladungsbestimmung

Vor Messung der Adsorptionsrate von Loperamid an HSA-NP wurde die Adsorption des Wirkstoffs an gelöstem HSA untersucht.

Es wurden 25 mg/ml HSA mit Loperamid in den Konzentrationen 0,0 - 1,0 mg/ml in einem Ethanol-MQ Gemisch (0,7 : 1) für 2 Std bei RT inkubiert. Anschließend wurde das HSA mit Microcon 10000 Filtern bei 14000 g in der Zentrifuge abgetrennt (60 min). In den erhaltenen Eluaten wurde die Konzentration des ungebundenen Loperamid nach einer 1 : 100 Verdünnung über HPLC-Analytik bestimmt. Die resultierenden Integrationsflächen wurden mit Hilfe einer Loperamid-Eichgerade (1 - 10 µg/ml) in Konzentrationen umgerechnet und in einer Adsorptionsisotherme dargestellt.

Für die Beladungsbestimmung der NP (siehe 3.4.2.1.) wurden die erhaltenen Loperamid haltigen Überstände 1 : 500 verdünnt und mittels HPLC-Analytik untersucht. Eine Eichgerade mit 1, 3, 5, 7 und 10,0 µg/ml Loperamid wurde mitbestimmt. Für die Konzentrationsbestimmung im Überstand wurden die erhaltenen Integrationsflächen mit Hilfe der Eichgerade in Konzentrationen umgerechnet.

3.5. Zellkultur

3.5.1. Zellaufnahme von ApoE-PEG-Nanopartikeln mittels CLSM

Für die CLSM-Aufnahmen von ApoE-PEG-NP (10 mg/ml NP mit 190 µg/ml ApoE) wurden Hep G2-, sowie β .End3-Zellen verwendet. Neben der Aufnahme von ApoE-PEG-NP wurden NeutrAvidin®-modifizierte NP als Kontroll-Zubereitung untersucht (12,5 mg/ml).

Für die CLSM Untersuchung wurden Hep G2-Zellen mit einer Zellzahl von 5e4 Zellen pro Well in Cover Slides (Lab Tek) ausplattiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen für 1 - 2 Tage in lipidfreiem Serum gehalten. Die Inkubation von zweimal gesorteten (siehe unten) Hep G2-Zellen erfolgte nach den 2 Tagen in lipidfreiem Medium für 4 Std mit ApoE-PEG-NP bzw. NeutrAvidin®-modifizierten NP in einer Konzentration von 250 µg/ml bei 37°C. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und eine Membranfärbung mit Rhodamin ConA durchgeführt. Die gefärbten Präparate wurden im CLSM untersucht.

Für die Versuche mit β .End3-Zellen wurden die Zellen für 1 bzw. 3 Std mit den Partikeln bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden 2 Tage zuvor auf Mikroskopierschälchen ausplattiert (0,75e5 Zellen) und mit DMEM/FCS bei 37°C inkubiert. Verwendet wurden Partikelkonzentrationen von 100 bzw. 1000 µg/ml. Nach der erfolgten Inkubation wurden die Zellen zweimal gewaschen und anschließend im CLSM (LSM510) untersucht. Die Unversehrtheit der Membran wurde mittels Trypan Blau-Färbung nachgewiesen.

Die Zellkultur-Experimente mit Hep G2-Zellen wurden von Frau Anke Schwedat am Georg-Speyer-Haus (Frankfurt a.M.) durchgeführt. Die Zellkultur Experimente mit β .End3-Zellen wurden am Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie (Berlin) in der Arbeitsgruppe von Frau Dr. Margitta Dathe durchgeführt.

Neben den Studien zur Zellaufnahme wurden am Georg-Speyer-Haus auch FACS-Versuche mit ApoE-PEG-NP und Hep G2-Zellen durchgeführt.

Für alle Versuche mit Hep G2-Zellen wurden die Zellen vor der Inkubation mit den Proben zweimal auf ihren LDLR hin untersucht. Zur Erhöhung der Rezeptordichte pro Zellzahl wurden die Zellen gesortet. Für das Sorten wurde

ein Erst-Antikörper gegen den LDLR eingesetzt (LDL-R (Ab-1)) sowie ein fluoreszenzmarkierter Zweit-Antikörper (Anti-mouse IgG (goat)). Die Zellen wurden im FACS auf ihre Antikörper-Bindung hin untersucht und die rezeptortragenden Zellen erneut in Medium inkubiert. Nach zweimaligem Sortieren und Bestimmung der Rezeptordichte wurden 5×10^4 Zellen pro Well auf 24-Well Platten ausplattiert und für weitere 1 - 2 Tage in lipidfreiem Medium gehalten. Die Zellen wurden mit 250 µg/ml NP-Suspension (ApoE-PEG-NP und PEG-modifizierte NP) für 4 Std inkubiert, gewaschen, trypsinisiert und im FACS auf die Bindung der NP an die Zellen untersucht. Für die PEG-modifizierten NP wurden HSA-NP mit einem 50- bzw. 100-fachen molarem Überschuß des mPEG5000-SPA von Nektar eingesetzt. Die Herstellung erfolgte analog der Crosslinker-Bindung an HSA-NP in Kapitel 3.4.1.3.2

3.5.2. Zellaufnahme von Antikörper-beladenen Nanopartikeln

Die Zellkultur-Experimente mit anti-HER2-Antikörper NP wurden von Heidrun Wartlick in der Abteilung für Molekulare Gynäkologie und Geburtshilfe des Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt durchgeführt.

Um die spezifische Bindung von Antikörper-modifizierten NP an Tumorzellen zu untersuchen, wurde die zelluläre Bindung an verschiedene Tumorzelllinien mit variierender HER2-Expression untersucht. Für die Untersuchung wurden SK-Br-3-, MCF7- und BT474-Zellen eingesetzt. Die Zellen wurden in 24-Well-Platten bis zu einer Konfluenz von 70% gehalten und anschließend mit anti-HER2-Antikörper-beladenen NeutrAvidin®-modifizierten NP sowie unbeladenen NeutrAvidin®-modifizierten NP mit einer Konzentration von 100 µg/ml bei 37°C behandelt. Um die Spezifität der NP Bindung an HER2 überexprimierenden Zellen zu zeigen, wurden die SK-Br-3 Zellversuche zusätzlich mit und ohne 30-minütiger Vorinkubation mit 2,5 µg/ml Trastuzumab durchgeführt. Nach einer Inkubationszeit von 3 Std wurden die Zellen gewaschen und zweimal mit PBS trypsinisiert, dann zentrifugiert und in FACS-Puffer resuspendiert. Die Proben wurden mit einem FACScan Flow Cytometer vermessen.

Neben den Untersuchungen zur zellspezifischen Aufnahme wurde auch die Kinetik der Bindung untersucht. Hierzu wurde eine Nanopartikelaufnahme in SK-Br-3 Zellen nach einem Inkubationszeitraum von 30 bis 180 min untersucht.

Die Zellen wurden mit 100 µg/ml Antikörper-beladenen und unbeladenen NeutrAvidin®-modifizierten NP bei 37°C inkubiert. Die Experimente wurden mit und ohne 30-minütiger Vorinkubation mit 2,5 µg/ml Trastuzumab durchgeführt. Die Auswertung erfolgte über FACS-Analyse. Neben der spezifischen Aufnahme und der Kinetikstudie wurden CLSM-Aufnahmen von SK-Br-3-Zellen nach NP-Inkubation gemacht. Hierzu wurden 2e5 Zellen in Slide Flasks ausplattiert und nach 12 Std mit 100 µg/ml anti-HER2-Antikörper-beladenen und unbeladenen NeutrAvidin®-modifizierten NP bei 37°C inkubiert. Die Inkubationszeit betrug 1 und 3 Std. Anschließend wurden die Zellen 2x mit PBS gewaschen und mit Alexa®594-ConA angefärbt. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen mit Paraformaldehyd fixiert und im CLSM untersucht. Zu den Zellversuchen und Ergebnissen siehe hierzu Wartlick et al., 2004.

3.6. *In vivo* Untersuchungen

3.6.1. Tail-Flick-Test

Der Tail-Flick-Test ist eine Methode zur Bestimmung der Schmerzwahrnehmung im Tierversuch. Über eine Infrarotwärmequelle wird gezielt ein Hitzereiz auf den Schwanz eines Versuchstieres ausgelöst. Sobald bei dem Tier ein Schmerzempfinden auftritt, zieht dieses den Schwanz von der Schmerzquelle weg. Diese Bewegung wird durch eine Photozelle registriert und die Reaktionszeit ermittelt (Isabel et al., 1981). Aus den resultierenden Reaktionszeiten der Tiere vor und nach Applikation der Zubereitung lassen sich dann MPE-Werte („maximal possible effect“-Wert) berechnen.

Der MPE-Wert wird zur Objektivierung und Quantifizierung physiologischer Daten im Vergleich eingesetzt. Die Berechnung erfolgt über die Formel:

$$\%MPE = \frac{\text{post drug latency} - \text{pre drug latency}}{\text{cut off time} - \text{pre drug latency}} \times 100\%$$

Erklärung zur Formel:

post drug latency = Reaktionszeit nach Applikation der Zubereitung

pre drug latency = Reaktionszeit vor Applikation der Zubereitung

cut off time = festgelegte Abbruchzeit des Versuchs (10 Sekunden)

3.6.2. Versuchstiere

Für den Tierversuch wurden weibliche ICR (CD 1)-Mäuse eingesetzt. Es handelte sich hierbei um einen Auszuchtstamm. Die Mäuse wurden mit einem Gewicht von 10 - 15 g von der Firma Harlan Winkelmann, Borcheln, bezogen und erst nach einer 14tägigen Eingewöhnungszeit im Tierversuch eingesetzt. Die Tiere hatten während der gesamten Zeit freien Zugang zu Wasser und Futter und wurden bei einem 12-stündigen Tag/Nachtrhythmus gehalten. Zum Zeitpunkt des Tierversuchs lag das Gewicht der Mäuse bei 20 - 25 g.

3.6.3. Durchführung

Die jeweiligen Zubereitungen wurden intravenös in die Schwanzvene appliziert. Die Applikation erfolgte über eine 1 ml Spritze und 0,45 x 23 mm Kanülen. Die Tiere erhielten eine Dosis der jeweiligen Zubereitung entsprechend ihres Körpergewichts. Bezogen auf den Wirkstoff entsprach die applizierte Dosis 7,0 mg/kg bzw. für die niedriger konzentrierte Zubereitung 4,0 mg/kg Körpergewicht. Die Messzeitpunkte lagen bei 15, 30, 45 und 60 min, bei länger anhaltender Wirkung wurden weitere Messungen bei 90, 120 und 180 min durchgeführt. Die Auswertung der Reaktionszeit erfolgte über Berechnung des MPE-Wertes. Jede Zubereitung wurde 8 Tieren appliziert.

3.6.4. Zubereitungen

Untersucht wurden folgende Zubereitungen in der ICR-Maus mit Hilfe des Tail-Flick-Apparates:

Tabelle 5 Übersicht über Zubereitungen zum Tierversuch mit ApoE-Biotin/NAv-NP

Versuch A mit ApoE-Biotin / NeutrAvidin®-modifizierten NP

Probe	Zubereitung	Polysorbat 80	ApoE [µg/ml]	Loperamid [mg/ml]	NAv-PEG-NP [mg/ml]
1	ApoE NP	1%	80	0,7	10
2	ApoE NP		80	0,4	10
3	NP			0,7	10
4	Loperamid Lsg			0,7	
5	NP			0,7	10
6	ApoE NP		80	-	10

Die Abkürzung NP in der Spalte Zubereitung steht für NeutrAvidin®-modifizierte HSA-NP, welche nach der Umkehr-Methode mit einem PEG-Crosslinker hergestellt wurden.

Tabelle 6 Übersicht über Zubereitungen zum Tierversuch mit ApoE-NP

Versuch B mit ApoE-PEG-NP

Probe	Zubereitung	ApoE [µg/ml]	Loperamid [mg/ml]	HSA-NP [mg/ml]
1	ApoE3 NP	190	0,7	10
2	ApoE2 Sendai NP	190	0,7	10
3	ApoE2 Arg142Cys NP	114	0,7	10

Im Versuch B wurden HSA-NP mit kovalent gebundenem ApoE eingesetzt, zur Bindung wurde der PEG-Crosslinker verwendet.

4. Ergebnisse und Diskussion

Die BHS wird in der Hauptsache von Hirnendothelien und den zwischen diesen Zellen befindlichen „*tight junctions*“ gebildet. Diese Barriere behindert den Transfer von Substanzen aus dem Blut der Peripherie in das Gehirn. Um nun diesen Transportweg für Stoffe zu ermöglichen, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein kolloidales Trägersystem zur Überwindung der BHS erarbeitet.

Kolloidale Trägersysteme wie NP wurden bereits für ein Hirntargeting eingesetzt (Kreuter, 1995; Alyautdin et al., 1997; Kreuter, 2001, Kreuter et al., 2002) und der Transport von verschiedenen nicht hirngängigen Wirkstoffe wie Kytorphin, Dalargin, Loperamid, Doxorubicin und Tubocurarin in das Gehirn mittels kolloidalen Trägersystemen untersucht. Die untersuchten Wirkstoffe zeigten nach Bindung an mit Polysorbat 80-überzogenen Poly(butylcyanoacrylat)-NP zentrale Effekte (Alyautdin et al., 1997; Alyautdin et al., 1998; Schröder et al., 1998; Ramge et al., 1999; Gulyaev et al., 1999). Weitere Experimente, die zur Klärung des Transportweges durchgeführt wurden, zeigten eine Adsorption von ApoE aus dem Blut auf der Oberfläche von Polysorbat 80-überzogenen PBCA-NP (Lück, 1997).

ApoE spielt eine wichtige Rolle beim Transport von Lipoprotein Partikeln in das Gehirn (Nimpf und Schneider, 2000). Lipoproteine binden über ihre Apolipoproteine an Mitglieder der Lipoprotein-Rezeptorfamilie wie beispielsweise den Rezeptoren LDLR und LRP und werden mit diesen Rezeptoren internalisiert (Dergunov, 2004; Ribalta et al., 2003). Für die Aufnahme von Lipoproteinen in das Gehirn spielt es eine wichtige Rolle, dass der Rezeptor auf der Oberfläche von Hirnendothelzellen exprimiert wird, zu diesen Rezeptoren zählen der LDLR und der LRP (Dehouck et al., 1997; Lucarelli et al., 2002).

In dieser Arbeit wurden HSA-NP mit gebundenem ApoE entwickelt, die einen Transport von Loperamid in das Gehirn ermöglichen sollten. Mit der festen Bindung des Liganden ApoE an die NP sollte eine Verbesserung des Trägersystems gegenüber dem bisher untersuchten mit Polysorbat 80-überzogenen PBCA-NP ermöglicht werden. Zum Einen kann mit

dem neuen System eine mögliche Desorption des Apolipoproteins von der Partikeloberfläche, wie es bei den bisher verwendeten Polysorbat 80-überzogenen PBCA-NP möglich wäre, verhindert werden. Zum Anderen ist durch eine feste Bindung des ApoEs an die NP das Tensid Polysorbat 80 in der Zubereitung nicht mehr notwendig. Zusätzlich sind HSA-NP bioabbaubar (Weber et al., 2000) und leicht in definierter Größe herzustellen (Langer et al., 2003). Die Partikel tragen auf ihrer Oberfläche Thiol-, Amino- und Carboxylgruppen über welche schnell und einfach Modifikationen der NP möglich sind (Langer et al., 2000; Weber et al., 2000; Wartlick et al., 2004). Durch die auf der Oberfläche der HSA-NP zugänglichen chemischen Gruppen können im Vergleich zu Polysorbat 80-überzogenen PBCA-NP Liganden kontrolliert an der Partikeloberfläche gebunden werden. Somit hängt die Bindung des ApoEs nicht von Adsorptionsprozessen ab. Für die Bindung des ApoEs wurden unterschiedliche Methoden angewendet. Zum Einen die Bindung des Liganden über ein Avidin / Biotin-System (Langer et al., 2000) und zum Anderen die direkte Kopplung des Liganden über einen Crosslinker. Die Herstellung der ApoE-NP über Avidin / Biotin erfolgte mit dem Hintergrund, ein System entwickeln zu wollen, dass den Vorteil eines variabel einsetzbaren Liganden zeigt (Kapitel 4.2). Zusätzlich zur schnellen Austauschbarkeit des Liganden bringt ein solches System den Vorteil mit sich, dass viele Liganden bereits fertig biotinyliert auf dem Markt erhältlich sind. Als Weiterführung des ersten Systems wurde ein Liganden-gebundenes NP-System entwickelt, dass mit einer direkten Bindung des ApoEs an die NP im Vergleich zur ersten Methode eine schnellere Herstellung bieten kann (Kapitel 4.3). Ein ausführlicherer Vergleich der beiden Systeme wird in Kapitel 4.4 diskutiert.

Neben den Albumin-NP mit dem gebundenen Liganden ApoE wurde auch der Ligand anti-HER2-Antikörper an der Nanopartikeloberfläche gebunden. Bei dem Ligand anti-HER2 handelt es sich um einen Antikörper aus der Brustkrebstherapie, der gegen das Oberflächenprotein (HER2) gerichtet ist. Das HER2-Gen kodiert für ein zellmembranständiges Rezeptorprotein mit Tyrosinkinase-Aktivität aus derselben Familie wie der Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor (Yarden und Ullrich, 1988). In entarteten Zellen hat man eine Amplifikation des Gens nachgewiesen, die zu einer

Überexpression des HER2-Rezeptors führt. Die Rezeptorzahl liegt bei betroffenen Zellen nicht wie üblich bei 10000, sondern 100-fach höher und führt so zum vermehrten Wachstum der Brustkrebszellen. Eine Bindung von Liganden an das Rezeptorprotein führt über eine Signalkaskade zu einem Proliferationsreiz im Zellkern. Eine HER2-Antikörpertherapie richtet sich gegen dieses Oberflächenprotein (HER2), welches bei 25 - 30% aller Frauen mit Brustkrebs in den Tumorzellen überexprimiert wird. An diesen Brustkrebszellen greift der monoklonale anti-HER2-Antikörper Trastuzumab (Herceptin®) an. Das HER2-Protein wird auf der Zelloberfläche blockiert und verhindert so das Auslösen von Wachstumssignalen. Zusätzlich ermöglicht der Komplex aus Antikörper und Rezeptor das Erkennen der Zelle durch die körpereigene Immunabwehr, wodurch die Krebszelle zerstört werden kann. Mit anti-HER2-gekoppelten NP kann der Antikörper zu den Zellen gelangen, dort wie eben beschrieben mit dem Rezeptor interagieren und so das Zellwachstum hemmen. Als weitere Möglichkeit können anti-HER2-gekoppelte NP mit Wirkstoffen aus der Brustkrebstherapie beladen werden. Durch die Rezeptorinteraktion der an die NP gebundenen Antikörper wird so ein Wirkstofftransport in die Zelle ermöglicht.

Neben der Entwicklung der verschiedenen ligandengekoppelten Trägersysteme wurde auch die Testung dieser Systeme *in vitro* durchgeführt. Hierzu wurde die Zellaufnahme der ApoE bzw. anti-HER2-gekoppelten Partikelsysteme in verschiedenen Zelllinien analysiert. Ziel der *in vitro* Versuche war es im Fall der ApoE-NP den Transportmechanismus des Wirkstoffs in das Gehirn zu klären. Dieser Wirkstofftransport war bereits in *in vivo* Studien an der Maus gezeigt worden. Bei den anti-HER2-gekoppelten NP wurde die Effizienz der Rezeptorbindung und der Zellaufnahme untersucht. Für die Zellkulturexperimente wurden jeweils Zellen eingesetzt, die eine erhöhte Expression des jeweiligen Ziel-Rezeptors aufwiesen. Für Versuche mit ApoE-gekoppelten NP wurden Hep G2-Zellen und β .End3-Zellen mit einem erhöhtem Vorkommen an LDL-Rezeptoren an der Zelloberfläche eingesetzt, für die Versuche mit anti-HER2-NP wurden unterschiedliche Zelllinien mit einer Überexpression des HER2-Gens verwendet. Durch Verwendung solcher

überexprimierenden Zellen lässt sich im Zellversuch leichter eine Bindung des Liganden an die rezeptortragenden Zellen nachweisen.

Wie bereits oben angesprochen wurden mit den ApoE-NP neben den *in vitro* auch *in vivo* Versuche durchgeführt. Dabei sollte ein möglicher Transport der Partikel über die BHS nachgewiesen werden. Als Modellwirkstoff wurde für die Untersuchungen Loperamid eingesetzt, bei welchem es sich um einen nicht hirngängigen zentralpharmakologisch wirksamen Stoff handelt. Daher kann dieser Wirkstoff als Indikator für einen erfolgreichen Stofftransport in das Gehirn dienen. Um den Transport von Loperamid beladenen ApoE-gekoppelten HSA-NP nach einer intravenösen Applikation in das Gehirn zu zeigen, wurden ICR-Mäuse verwendet und im Tail-Flip-Test untersucht.

Abbildung 5 zeigt zu dem oben genannten Vorgehen ein Fließschema der Herstellungs- und Untersuchungsschritte dieser Arbeit.

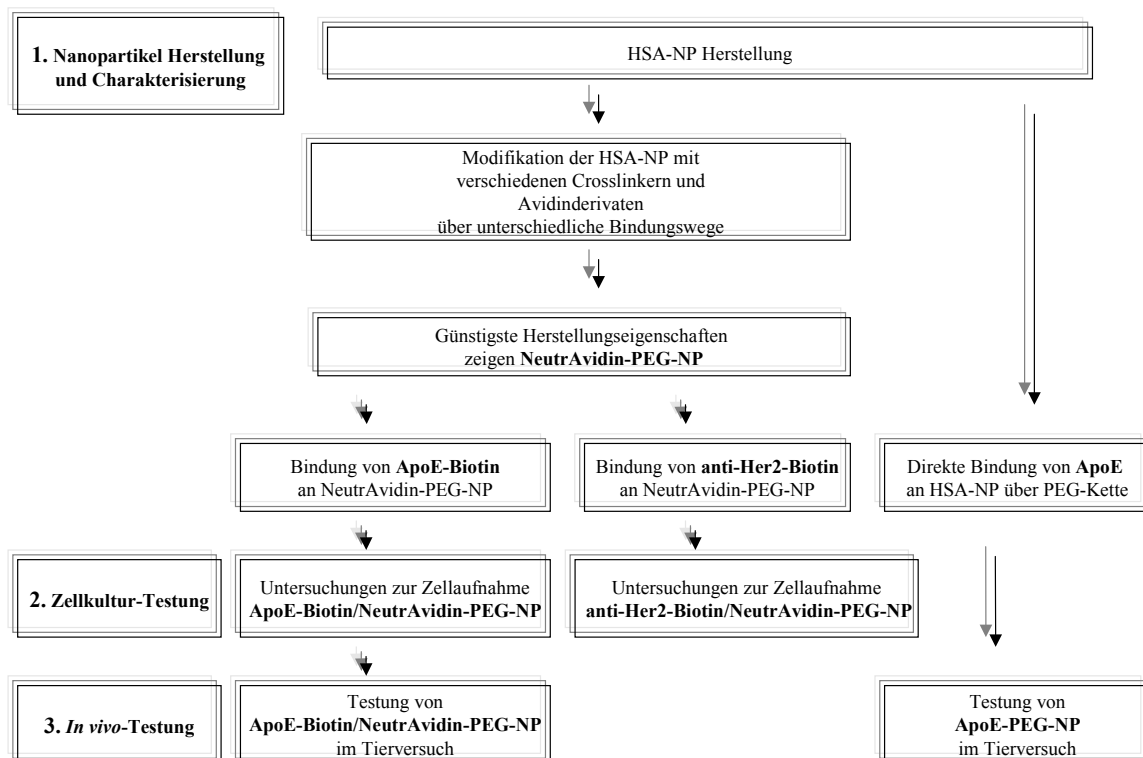


Abbildung 5 Fließschema zur Übersicht von Herstellung und Testung modifizierter HSA-NP

4.1. Nanopartikelherstellung und Charakterisierung

Die Herstellung der HSA-NP erfolgte in Anlehnung an eine Desolvationsmethode, die von Marty et al. (1978) für Gelatine und andere Proteine beschrieben und von Weber et al. (2000a) überarbeitet wurde. Die Partikelgröße der hergestellten unmodifizierten HSA-NP lag bei 200 ± 8 nm ($n = 3$).

4.1.1. Gravimetrie

Der Gehalt der aufgereinigten HSA-NP Suspension wurde gravimetrisch bestimmt. Auf den Proteingehalt können im weiteren Charakterisierungs- und Herstellungsprozess andere ermittelte Daten bezogen werden. So wurden die ermittelten Aminogruppen (siehe Kapitel 4.1.2) auf den ermittelten HSA Anteil pro ml bezogen. Außerdem wurden für die weiteren Modifikationsschritte die benötigten Konzentrationen von Umsetzungsreagentien auf den gravimetrisch ermittelten Proteingehalt der Nanopartikelsuspension bezogen und Proteinbindung bzw. Ligandenbindung mittels des ermittelten Albumingehalts berechnet.

Der ermittelte Gehalt der aufgereinigten Nanopartikelsuspension betrug im Mittel 22 mg/ml, was einer Albuminkonzentration [MW 65 kDa] von $3,38 \times 10^{-7}$ mol/ml entspricht.

Die fertigen Endzubereitungen wurden jeweils auf einen Partikelgehalt von 10 mg/ml eingestellt.

4.1.2. Aminogruppen

Okuyama und Satake beschrieben 1960 erstmals die spezifische Umsetzung von 2,4,6-Trinitrobenzensulfonsäure (= TNBS) mit freien Aminogruppen zu Trinitrophenylderivaten (= TNP-Derivate). Habeeb (1966) nutzte diese Bestimmung 6 Jahre später, um freie Aminogruppen von bovinem Serumalbumin nach der Umsetzung mit Formaldehyd zu bestimmen. Auf diesen Erkenntnissen aufbauend wurde ein Protokoll zur Bestimmung der freien Aminogruppen auf HSA-NP (Weber et al., 2000a) entwickelt, wie es im Kapitel 3.3.3 beschrieben wird.

Bei der TNBS-Reaktion greifen die Aminogruppen des Partikelsystems das TNBS im Sinne einer nukleophilen, aromatischen Substitution an, wie es im Reaktionsschema der Abbildung 6 dargestellt wird. Da das Endprodukt der TNBS Umsetzung nicht löslich ist, werden zur Bestimmung der Aminogruppen die NP mit dem abreagierten TNP-Protein-Konjugat abzentrifugiert und das nicht abreagierte TNBS im Überstand photometrisch bestimmt. Die Differenz zwischen TNBS-Ausgangskonzentration und nicht abreagiertem TNBS entspricht der Menge an umgesetztem, gebundenem TNBS und damit der Anzahl der freien Aminogruppen an der Partikeloberfläche.

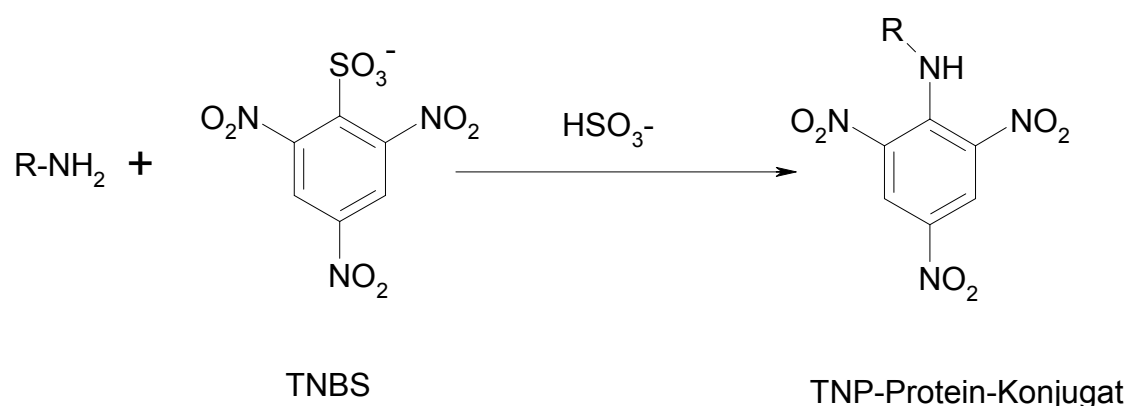


Abbildung 6 Reaktionsschema der TNBS-Reaktion

Die Bestimmung der Aminogruppen gibt Aufschluss darüber wie viel reaktive Gruppen der Partikeloberfläche im weiteren Schritt für die Modifikation zur Verfügung stehen. Bei der Herstellung von NeutrAvidin®-modifizierten NP sind zwei Modifikationswege möglich, wie unter 3.4.1. beschrieben. Zum einen können Thiolgruppen eingeführt werden, um daran die SH-Gruppenreaktive Seite eines Crosslinkers zu binden, zum anderen können die Aminogruppen direkt mit der Amino-reaktiven Seite eines Crosslinkers reagieren. Im ersten Fall würde eine Avidin-Komponente für die Modifikation an die Amino-reaktive Seite des Crosslinkers gebunden werden, im anderen Fall müsste die Avidin-Komponente thioliert werden, um mit der SH-reaktiven Seite des Crosslinkers zu reagieren. In beiden Fällen werden Aminogruppen auf der Partikeloberfläche für die Umsetzung benötigt.

Es wurden $10,9 \pm 1,0$ mol Aminogruppen pro mol Albumin ($n = 5$) bestimmt. Dieses Ergebnis weist auf eine mögliche Einführung von SH-Gruppen an die hier bestimmten Aminogruppen hin.

4.2. Herstellung Liganden-gekoppelter NeutrAvidin®-modifizierter Nanopartikel

Die Bindung von Liganden an Arzneiträgersysteme ist ein seit langem eingesetztes Verfahren zum zielgerichteten Ansteuern von Zielgewebe oder Zielzellen (Lundberg et al., 1993; Coloma et al., 2000; Olivier et al., 2002; Zhang et al., 2002; Li et al., 2003). Als Ziel wurde in dieser Arbeit zum einen das Gehirn mit seiner schwer zu überwindenden BHS und zum anderen Brustkrebszellen gewählt. Als Liganden wurden ApoE und anti-HER2-Antikörper untersucht, da beide Liganden an ihrem Zielort an einen spezifischen Rezeptor binden können und so in der Lage sind an ihr Ziel zu gelangen.

Die Bindung von Liganden für ein Zelltargeting kann direkt an der Oberfläche der Partikel erfolgen oder aber über das Avidin / Biotin-System. Der Vorteil des Avidin/Biotin-Bindungssystems liegt darin, dass im Vergleich zur direkten Kopplung kleinere Mengen der verwendeten Liganden eingesetzt werden müssen, um die gleiche Menge Ligand zu binden. Bei teuren oder nur in geringer Menge zur Verfügung stehenden Liganden bietet somit die Kopplung über Avidin / Biotin einen deutlichen Vorteil. Zusätzlich ermöglicht die Bindung von biotinylierten Liganden an Trägersysteme über das Avidin / Biotin-System einen schnellen und einfachen Ligandenaustausch. Problematisch wird die Verwendung des Hühnerproteins Avidin im Bereich einer möglichen Immunogenität gesehen.

Die Avidin / Biotin-Bindung

Das Prinzip der Bindung von biotinylierten Liganden über Avidin-modifizierte NP wurde von Langer et al. (2000) beschrieben.

Das aus Hühnereiweiß gewonnene Avidin ist ein Glykoprotein mit einem isoelektrischen Punkt von ≈ 10 . Avidin mit einem Molekulargewicht von 67 kDa

ist ein Tetramer und besteht aus vier identischen Untereinheiten. Charakteristisch ist seine extrem hohe Bindungsaffinität zu Biotin mit einer Bindungskonstante von $K_a = 10^{15} \text{ M}^{-1}$. Damit stellt die Avidin / Biotin Bindung das stärkste nichtkovalente biologische Bindungssystem zwischen Protein und Ligand dar (Savage et al., 1994). Die Bindung erfolgt sehr rasch und ist nach der Ausbildung über einen pH-Bereich von 2 - 13, bei extremen Temperaturen (kurzfristig bis zu 132°C), gegenüber organischen Lösungsmitteln und anderen Denaturierungsagentien relativ unempfindlich. Auch findet im Verdauungstrakt kein enzymatischer Abbau der Bindung statt. Gelöst werden kann diese Bindung durch den Zusatz von 8 M Guanidin HCl-Lösung bei pH 1,5. Wichtig hinsichtlich der kovalenten Bindung an das Partikelsystem ist die Unempfindlichkeit der Aktivität bei der Modifikation funktioneller Gruppen des Avidins. Eingesetzt wird das Avidin / Biotin Bindungssystem in weiten Bereichen der Affinitätschromatographie, der Detektion bei Immunoassays und der Immobilisierung von Enzymen (Savage et al., 1994).

Zur Gruppe der biotinbindenden Proteine zählt auch das NeutrAvidin[®], das sich aber von der Struktur des Avidins unterscheidet. Hierbei handelt es sich um ein partialsynthetisches Avidinderivat ohne Kohlenhydratreste mit einem isoelektrischen Punkt von 6,3. Der Vorteil des NeutrAvidin[®] gegenüber Avidin liegt in seiner geringeren unspezifischen Zelladhäsion.

4.2.1. Avidin / NeutrAvidin[®]-modifizierte Nanopartikel

Zur Verknüpfung von Avidinkomponente und NP werden Crosslinker eingesetzt. Diese weisen reaktive Endgruppen auf. Heterobifunktionale Crosslinker, wie die hier verwendeten, haben zwei verschiedene Endgruppen: eine SH-Gruppen-selektive Bindungsstelle und eine Aminogruppen-reaktive. Dabei bindet eine Maleinimid-Struktur an SH-Gruppen und ein NHS-Ester an Aminogruppen.

Von einem heterobifunktionalen Crosslinker ausgehend stehen zwei mögliche Wege für die Modifikation der NP zur Verfügung:

- 1.: Thiolierung von HSA-NP und Aktivierung der Avidin-Komponente
- 2.: Thiolierung der Avidin-Komponente und Aktivierung der HSA-NP

Der erste Weg wurde bereits mehrfach in Artikeln der Arbeitsgruppe Langer beschrieben (Langer et al., 2000; Weber et al., 2000c). Diese Methode wurde in der vorliegenden Arbeit mit unterschiedlichen Crosslinkern eingehend

untersucht und wird nachstehend als Konventions-Methode bezeichnet (siehe hierzu auch Abbildung 7).

Der zweite Weg verläuft ähnlich dem Ersten, der verwendete Crosslinker wird umgekehrt zwischen der Avidin-Komponente und dem Partikel eingeführt (siehe Abbildung 8). Diese Methode wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit neu entwickelt und für die Partikelherstellung und Testung der NP *in vivo* und *in vitro* angewendet.

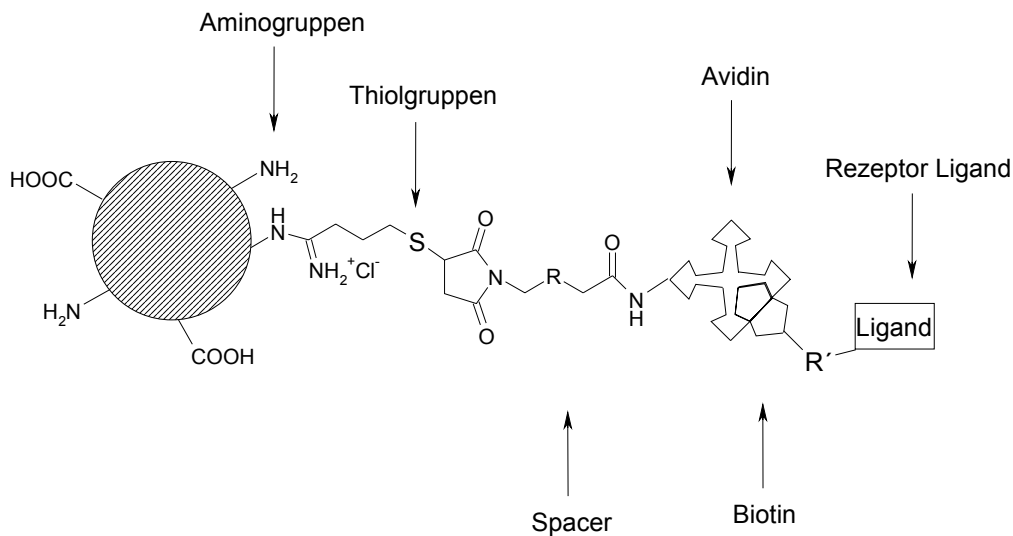


Abbildung 7 Partikelsystem nach der Konventions-Methode

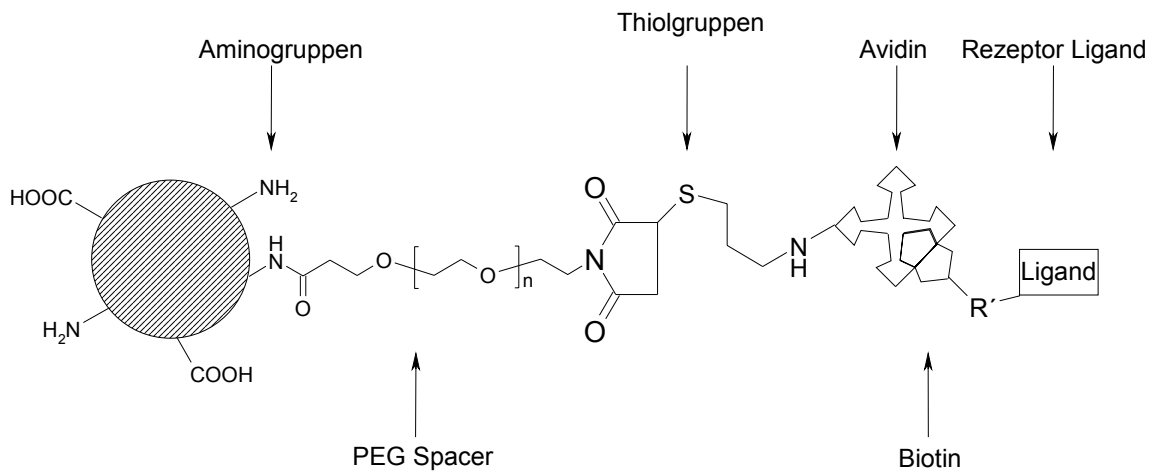


Abbildung 8 Partikelsystem nach der Umkehr-Methode

4.2.1.1. Konventions-Methode

Die Herstellung, Modifikation und Charakterisierung der einzelnen Herstellungsschritte erfolgte in Anlehnung an die Arbeiten von Weber et al.

(2000a-c) und Langer et al. (2000). Die Durchführung der Avidinderivat Kopplung an HSA-NP erfolgte wie in den Artikeln beschrieben und wurde zusätzlich mit unterschiedlichen Crosslinkern durchgeführt.

4.2.1.1.1. SH-Gruppen Einführung

Für die Bindung eines Crosslinkers an SH-Gruppen sind reaktive Sulfhydrylgruppen auf der Partikeloberfläche notwendig. Die Primärstruktur des HSA enthält zwar 35 SH-Gruppen tragende Cysteinreste, davon sind aber 17 in Disulfidbrücken fixiert und stehen daher für die Bindung des Crosslinkers nicht zur Verfügung. Um für die spätere Crosslinkerbindung ausreichend Thiolgruppen zur Verfügung zu haben, wurden die Aminogruppen auf der Partikeloberfläche nach der Herstellung der HSA-NP zur Einführung von SH-Gruppen mit Trauts Reagenz umgesetzt. Die Bestimmung der eingeführten SH-Gruppen an den thiolierten NP wurde mit Ellmans Reagenz durchgeführt.

Bei der Bestimmung der Thiolgruppen mit Ellmans Reagenz reagiert die 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoesäure) = DTNB unter Ausbildung eines gemischten Disulfids = NP-TNB mit der SH-gruppenhaltigen Substanz. Das dabei frei werdende Dianion hat ein Absorptionsmaximum mit einem Extinktionskoeffizienten von $14000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ bei 412 nm (Riddles et al., 1979). Nach dem Abzentrifugieren des NP-TNB-Konjugats kann das freie Dianion im Überstand bestimmt und über die Eichgerade die Menge an eingeführten SH-Gruppen berechnet werden.

Mit Ellmans Reagenz konnten durchschnittlich $11,2 \pm 0,8$ mol SH-Gruppen pro mol thioliertem HSA ($n = 6$) nachgewiesen werden. Das Ergebnis zeigt eine quantitative Reaktion der Aminogruppen mit dem Thiolierungsreagenz. Die ursprünglichen 11 mol Aminogruppen pro mol Albumin konnten zu den reaktiven Thiolgruppen umgesetzt werden. Damit besteht die Möglichkeit, im nächsten Modifikationsschritt NP und Proteinkomponente über einen Crosslinker miteinander zu verbinden.

4.2.1.1.2. Konjugation und Bindungseffizienz

Für die Konjugation von NP mit einer Proteinkomponente wurde der Einsatz unterschiedlicher Crosslinker mit verschiedenen Avidinkomponenten untersucht.

In Tabelle 7 werden die Ergebnisse dieser systematischen Untersuchung der verschiedenen getesteten Crosslinker im Hinblick auf eine möglichst hohe Proteinbindung dargestellt.

Zur Bestimmung der Bindungseffizienz der Avidinkomponente an die NP wurde die Absorption der erhaltenen Überstände nach der Inkubation von thiolierten NP und aktiviertem Av/NAv (Vollprobe) untersucht. Die Absorptionswerte der Überstände wurden nach Subtraktion der Absorptionswerte von thioliertem NP/MQ-Überstand auf die Absorptionswerte des 100%-Werts bezogen und als Wiederfindung in % angegeben. Zur Bestimmung der unspezifischen Bindung wurden die Absorptionswerte der Überstände von unmodifizierten NP/MQ von den Absorptionswerten des Überstandes von unmodifizierten NP/aktiviertem Av/NAv (Vergleichsprobe) abgezogen und der erhaltene Wert über die Absorption des 100%-Werts in die Wiederfindung [%] umgerechnet. Zur Bestimmung der kovalenten Bindungseffizienz muss die Bindung (100% minus Wiederfindung) der Vollprobe im Vergleich zur Bindung in der Vergleichsprobe betrachtet werden.

Tabelle 7 Übersicht zu den untersuchten Crosslinkern und ihrer Bindungseffizienz bei der Konventions-Methode

Crosslinker	Hersteller	Avidinkomponente	Hersteller	Ergebnis
sulfo-MBS	Biosciences	Avidin	Molecular Probes	82% Bindung
sulfo-MBS	Biosciences	NAv	Molecular Probes	0% Bindung
sulfo-MBS	Uptima	Avidin	Molecular Probes	Flockung
sulfo-MBS	Uptima	Avidin	Pierce	Flockung
sulfo-MBS	Uptima	NAv	Pierce	4% Bindung
sulfo-MBS	Pierce	Avidin	Molecular Probes	Flockung
sulfo-MBS	Pierce	NAv	Pierce	0% Bindung
sulfo-MBS	Pierce	NAv	Molecular Probes	0% Bindung
sulfo-KMUS	Biosciences	Avidin	Molecular Probes	0% Bindung
sulfo-SMPB	Pierce	Avidin	Molecular Probes	Flockung
sulfo-SMCC	Biosciences	Avidin	Molecular Probes	30% Bindung
sulfo-SMCC	Biosciences	NAv	Pierce	7% Bindung
NHS-PEG-Mal	Nektar	Avidin	Molecular Probes	0% Bindung
NHS-PEG-Mal	Nektar	Nav	Pierce	0% Bindung

Die photometrische Auswertung der Bindungseffizienz der beiden Avidinkomponenten Av und NAv an HSA-NP zeigte bis auf eine Ausnahme (erste Zeile der Tabelle) eine relativ schlechte Bindung. Bei der Aktivierung des Av/NAv mit den Crosslinkern kam es häufig zur sofortigen Flockung des Systems, so dass eine weitere Umsetzung nicht möglich war. Zeigte sich keine Flockung, wurde die Umsetzung mit den HSA-NP weiter durchgeführt. Bei der Auswertung der Kopplung konnte nur sulfo MBS von Molecular Biosciences (dieses Produkt befindet sich nicht mehr im Handel) eine zufriedenstellende Bindung von 82% vorweisen. Dies entspricht 0,024 mol Avidin/mol HSA. Die 30% Bindung des Avidins über sulfo SMCC bezieht sich auf eine sehr geringe Ausbeute des thiolierten Avidins nach Säulenaufreinigung, was die tatsächliche Bindungseffizienz relativiert und zu keiner zufriedenstellenden Bindung führt.

4.2.1.2. Umkehr-Methode

Der ursprüngliche konventionelle Weg zur Herstellung von Avidin-modifizierten NP zeigte nur eine geringe Bindungseffizienz der Avidinkomponente an die NP. Ziel war es daher mit der Umkehrung des Herstellungsprozesses bzw. des Crosslinkereinbaus eine verbesserte Bindungsrate zu erhalten.

4.2.1.2.1. SH-Gruppen Einführung

Für die Bindung der Maleinimidseite des Crosslinkers an die Avidinkomponente musste das Avidin zuvor mit Trauts Reagenz thioliert werden (siehe hierzu auch Kapitel 4.2.1.1.1.). Die eingeführten SH-Gruppen in der thiolierten Avidinkomponente wurden mit Hilfe von Ellmans Reagenz untersucht (Weber et al., 2000b). Die Bestimmung ergab für NeutrAvidin® $1,6 \pm 0,4$ mol SH-Gruppen pro mol NAv ($n = 5$) bzw. 3,8 mol/mol für Avidin.

4.2.1.2.2. Konjugation und Bindungseffizienz

Bei der Erstellung des Protokolls zur Umkehr-Methode wurde das Protokoll der konventionellen Methode leicht variiert. Die Umsetzung von Crosslinker und NP erfolgte bei pH 8 statt wie bisher bei pH 7. Zusätzlich wurde die Inkubationszeit der Avidin/NP Kopplung auf 24 Std erhöht.

Die Bestimmung der Bindung der thiolierten Avidinkomponente an aktivierte NP erfolgte analog der Durchführung, wie sie in Kapitel 4.2.1.1.2. beschrieben wird. Die Ergebnisse des Konjugationsversuchs von NP und Avidinkomponente wird für die verschiedenen Crosslinker in der untenstehenden Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8 Übersicht zu den untersuchten Crosslinkern und ihrer Bindungseffizienz bei der Umkehr-Methode

Crosslinker	Hersteller	Avidinkomponente	Hersteller	Ergebnis
NHS-PEG3400-Mal	Nektar	NAv	Pierce	30% Bindung
sulfo-MBS	Uptima	Avidin	Molecular Probes	0% Bindung
sulfo-MBS	Uptima	NAv	Pierce	13% Bindung
sulfo-MBS	Pierce	Avidin	Molecular Probes	12% Bindung

Die Bindungseffizienz ließ sich durch das modifizierte Protokoll für einige Ansätze deutlich verbessern. Der Crosslinker NHS-PEG3400-Mal führte mit einer durchschnittlichen Bindungseffizienz von 30% zu einer Bindung von 0,026 mol NAv/mol HSA. Damit konnte eine vergleichbare Bindung wie bei der Kopplung von Av (Molecular Probes) mit sulfo-MBS (Molecular Biosciences) auf dem konventionellen Weg erzielt werden.

Die Bindung mit dem Crosslinker sulfo-MBS von Uptima bzw. Pierce konnte auf über 10% gesteigert werden, was einer Bindung von 0,013 mol/mol HSA entspricht. Die veränderten Bedingungen des Protokolls wurden auch auf die konventionelle Herstellungsmethode übertragen, die Bindungsergebnisse blieben dadurch jedoch unbeeinflusst und es konnte keine verbesserte Bindungsrate erzielt werden.

Aufgrund der effizienten Bindung von NeutrAvidin® an HSA-NP mittels PEG-Crosslinker wurden diese NP in den *in vitro* und *in vivo* Versuchen eingesetzt. Die Partikelgröße dieser NeutrAvidin®-modifizierten NP lag bei 251 ± 10 nm ($n = 3$).

4.2.1.3. Funktionalitätsbestimmung des eingeführten Avidins / NeutrAvidins®

Nach der Kopplung von Avidinderivaten auf der Partikeloberfläche war nicht zu erwarten, dass alle vier Biotinbindungsstellen des Avidins bzw. NeutrAvidins® frei zur Verfügung stehen. Es konnte angenommen werden, dass durch die Kopplung des Avidins an die Partikel die Bindung des Biotins an das Avidinderivat durch sterischen Hinderung erschwert wird. Die sterische Hinderung könnte zum einen durch den Kopplungsvorgang des Proteins an dem NP an sich entstehen, das heißt durch den Crosslinker bzw. die nahe Partikeloberfläche. Zum anderen kann der Zugang des Biotins zu den Bindungsstellen durch die großen Avidin-Moleküle auf der Partikeloberfläche gegenseitig erschwert werden. Um die tatsächlich zur Verfügung stehenden Biotinbindungsstellen auf den NeutrAvidin®-modifizierten NP zu erfassen, wurde ein B4F-Assay durchgeführt. Die Entwicklung des Assay basiert auf den Daten und Erkenntnissen von Gruber et al. (1998) und Kada et al. (1999a, b).

Biotin-4-Fluorescein (B4F) besteht aus Biotin und einem fluoreszierenden Molekül; Biotin und Fluorescein sind über ein vier-Atome langes Zwischenstück

(Ethylendiamin) miteinander verbunden. Dieses Derivat bindet ähnlich schnell und effektiv wie unmodifiziertes D-Biotin an die Biotinbindungsstellen von Avidinderivaten und zeigt dabei eine ähnlich hohe Bindungsaffinität zum Avidin. Das kommerziell erwerbbare B4F bindet stöchiometrisch an Avidinderivate (4 : 1) und zeigt dabei ein starkes Quenching der Fluoreszenz von B4F im gebundenen Zustand. Für die Erfassung der Biotinbindungsstellen von Avidin-modifizierten NP läßt sich eine NP-Suspension mit einer aufsteigenden Konzentration von B4F nicht-kumulativ titrieren. Das Erfassen der Fluoreszenz bei ansteigender B4F-Konzentration in der NP-Suspension zeigt zu Beginn der Titration nur eine leichte Erhöhung der Fluoreszenz (weißer Kurventeil in Abbildung 9), was auf das Quenching bei Bindung des B4F an das Avidin zurückzuführen ist. Nach Überschreiten eines Wendepunktes und weiterer Zugabe von B4F steigt die Fluoreszenz stetig und linear an (schwarzer Kurventeil in Abbildung 9). Bei Auswertung der Titrationskurve läßt sich die notwendige Konzentration an B4F-Lösung ermitteln, die benötigt wird, um alle Biotinbindungsstellen in der Suspension mit B4F zu besetzen.

Für die Bestimmung der verbrauchten B4F-Menge bis zur vollständigen Besetzung aller zur Verfügung stehenden Biotinbindungsstellen wird der Schnittpunkt beider Ausgleichsfunktionen ermittelt. Dieser wird mathematisch durch Gleichsetzen der beiden Funktionen der Titrationskurve berechnet.

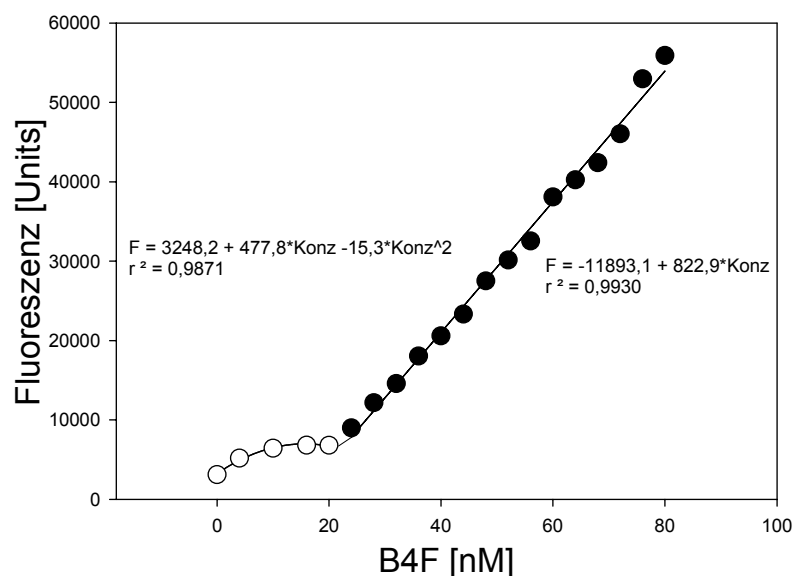


Abbildung 9 Titrationskurve von NAv

In Vorversuchen wurde gezeigt, dass sich der Assay für die Erfassung von Biotinbindungsstellen in NeutrAvidin®- und Avidin-Lösungen prinzipiell eignet. Weitere Versuche zeigten, dass auch die Titration von NP-Suspension möglich ist.

Die Abbildung 9 zeigt die Titration von 7,5 nM NeutrAvidin®-Lösung mit einem theoretischen Verbrauch von 30 nM B4F-Lösung, um alle Bindungsstellen abzusättigen. Die Auswertung der beiden erhaltenen Funktionen ergibt einen Schnittpunkt der beiden Kurven bei 22,1 nM. Daraus resultiert ein Verhältnis von NAv zu Biotinbindungsstellen von 1 : 3. Bei der Titration von NeutrAvidin®-modifizierten NP wurde ein durchschnittliches Verhältnis von 1 : $2,6 \pm 0,6$ (n = 6) bestimmt.

Das Erfassen der Bindungsstellen in einer Avidinlösung zeigte ein Verhältnis von Avidin zu Biotinbindungsstellen von durchschnittlich 1 : $3,9 \pm 0,2$ (n = 5) und in einer Suspension von Avidin-modifizierten NP ein Verhältnis von 1 : $3,4 \pm 0,5$ (n = 5).

Bei einem Vergleich der Bindungsverhältnisse der Avidinderivat-Lösungen und der NP-Suspensionen zeigt sich eine geringere Bindung des B4F an die nanopartikelgebundenen Avidinderivate. Dieses Ergebnis bestätigt, dass eine Bindung der Avidinkomponente an NP zu einer Reduktion der zur Verfügung stehenden Biotinbindungsstellen führt.

4.2.2. Bindung von Liganden über das NeutrAvidin®/Biotin-System

Bei Ausnutzung des Avidin / Biotin-Systems zur Kopplung von Liganden an Trägersysteme muss die Avidin-Komponente über einen Crosslinker an der Partikeloberfläche gebunden (beschrieben unter Kapitel 3.4.1.) und der zu koppelnde Ligand in einem separaten Schritt biotinyliert (beschrieben unter 3.4.1.6.1.) werden, anschließend können Av/NAv-modifizierte NP und biotinylierter Ligand miteinander verbunden werden. Für die Bindung der biotinylierten Liganden wurden aufgrund der höheren Bindungsergebnisse von NeutrAvidin® an NP nur NeutrAvidin®-modifizierte NP eingesetzt.

4.2.2.1. Biotinylierung von Liganden

Beide Liganden, ApoE und anti-HER2-Antikörper, wurden jeweils für die Biotinylierung mit einem Amino-reaktiven Biotinderivat umgesetzt und anschließend aufgereinigt. Danach erfolgte die Quantifizierung der Biotinylierungsreaktion mit einer geeigneten Methode.

4.2.2.2. Quantifizierung des Biotinylierungsgrades

Nach erfolgter Biotinylierung von Antikörper und Protein mit den Reagenzien NHS-Biotin bzw. PFP-Biotin wurde bestimmt, inwieweit die Bindung erfolgreich war bzw. wie viele Biotin-Moleküle an jedes Protein gebunden wurden.

4.2.2.2.1. Western Blot zur Bestimmung des Biotinylierungsgrades von ApoE

Untersucht wurden das aufgereinigte ApoE nach der Biotinylierung in einer 1 : 1 Verdünnung mit MQ sowie der erste und zweite Üb der Aufreinigung einer ApoE-NP-Probe. Für die NP-Probe wurden NeutrAvidin®-modifizierte NP mit der aufgereinigten Biotin-ApoE-Lösung über Nacht inkubiert (siehe Kapitel 3.4.1.6.3.1.). Alle drei Proben enthielten durch die Verdünnung bzw. Umsetzung mit der NP-Suspension maximal 80 µg/ml biotinyliertes ApoE. Die Proben können so im WB über die erhaltenen Banden miteinander verglichen werden. Die Bestimmung des Biotinylierungsgrades mittels Western Blot kann nicht quantitativ erfolgen. Ein Vergleich der optischen Dichte der resultierenden Banden ermöglicht nur eine qualitative Aussage.

Die ApoE-Biotin-Probe stellt im Vergleich zu den Überständen den 100%-Wert dar.

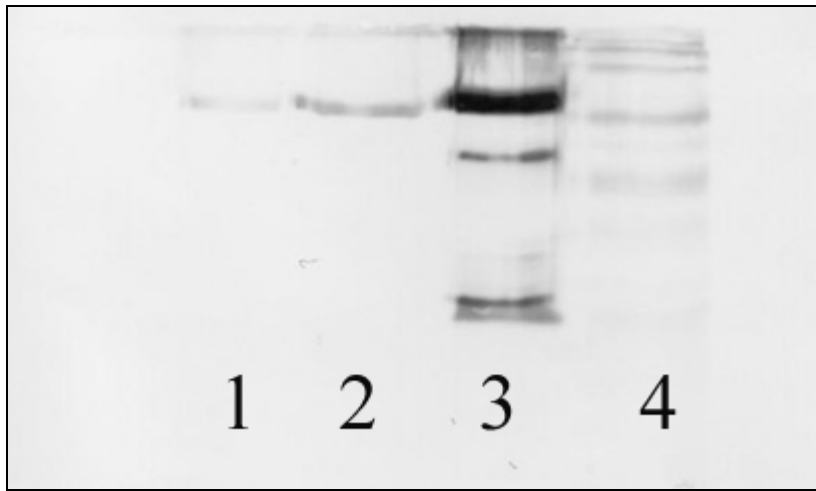


Abbildung 10

Western Blot zum Nachweis der erfolgten Biotinylierung

Im abgebildeten WB (Abbildung 10) sind in Lane 1 die Bande des zweiten und in Lane 2 die Bande des ersten Überstandes der ApoE-NP Präparation zu sehen. Lane 3 zeigt in einer dicken Bande das biotinylierte ApoE nach Aufreinigung und 1 : 1 Verdünnung, Lane 4 den Größenmarker. Biotin wurde mittels Streptavidin-Konjugat detektiert. ApoE hat ein Molekulargewicht von 34,2 kDa, während reines Biotin nur eine Größe von 244 Da aufweist und ungebunden nicht auf der Membran zu detektieren sein dürfte. Die erhaltenen Banden der Biotindetektion befinden sich auf der Höhe der Markerbande von 32,5 kDa und geben damit den Hinweis auf die erfolgreiche Bindung von Biotin und ApoE.

Die Überstände der NP Aufreinigung zeigen zusätzlich eine Abnahme des ApoE-Biotingehalts im Überstand der ApoE-NP Suspension im Vergleich zu der dicken Bande in Lane 3 des ApoE-Biotin, welche hier als 100%-Wert betrachtet werden kann. Es kann daher angenommen werden, dass die Abnahme des Biotinrestes des biotinylierten ApoE im Überstand auf eine Bindung des biotinylierten ApoE an die NeutrAvidin®-modifizierten NP zurückzuführen ist.

4.2.2.2.2. HABA-Assay zur Bestimmung des Biotinylierungsgrades von Antikörpern

Beim HABA-Assay wird eine Avidinlösung bekannter Konzentration mit einem 40-fachen Überschuss HABA versetzt. HABA bindet dabei an die Biotinbindungsstellen des Avidins. Bei Zugabe einer unbekannten Menge Biotin verdrängt dieses aufgrund seiner höheren Affinität das HABA aus dem HABA/Avidin-Komplex, wodurch es zu einer farblichen Veränderung der Reaktionslösung kommt. Vor Biotinzugabe weist der HABA/Avidin-Komplex eine rote Färbung auf, welche nach Verdrängung des HABA aus den Biotinbindungsstellen nach gelb umschlägt. Das verdrängte und somit frei gewordenen HABA verhält sich äquivalent zur zugefügten Biotinmenge, wodurch eine Quantifizierung der Biotinmenge photometrisch möglich wird.

Die Biotinkonzentration in der Antikörperlösung wird über die Absorptionsveränderung ΔA_{500} der Komplexlösung bei 500 nm Wellenlänge und den Extinktionskoeffizient des HABA/Avidin-Komplexes ($\epsilon_{500} = 34000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) ermittelt.

$$\Delta A_{500} = (\text{Abs}_{500} \text{ HABA/Avidin-Komplex}) - (\text{Abs}_{500} \text{ nach Biotinzugabe})$$

$$\text{Biotin Gehalt } [\mu\text{mol/ml}] = \Delta A_{500} / 34$$

Der durchschnittliche Biotinylierungsgrad des Antikörpers liegt bei ein bis zwei Biotin-Molekülen pro anti-HER2-Antikörper (Wartlick et al., 2004).

4.2.2.3. Bindung von biotinylierten Liganden an NeutrAvidin[®]-modifizierte Nanopartikel

4.2.2.3.1. Biotin-ApoE Bindung und Quantifizierung

Zur Herstellung der ApoE-Biotin/NeutrAvidin[®]-NP wurde die ApoE-Biotin-Lösung mit den NeutrAvidin[®]-modifizierten NP umgesetzt. Nach der ApoE-Biotin-Beladung der Partikel nahm deren Größe stark zu, hier wurden Größen von $450 \pm 9 \text{ nm}$ ($n = 3$) gemessen. Diese vergrößerten ApoE-beladenen NeutrAvidin[®]-modifizierten NP wurden vor der Anwendung im Tier durch 10-minütige Ultraschallbehandlung auf eine Größe unter 350 nm eingestellt.

Die gemessene Größenzunahme nach der Inkubation der NeutrAvidin®-modifizierten NP mit ApoE-Biotin spiegelte sich auch optisch erkennbar in der Flockung des NP-Systems wieder. Dabei kam es in dem zuvor kolloidalen System zur Sedimentation und Aggregatbildung der NP; dieser Vorgang wurde bei Anwesenheit von Puffersalzen noch weiter verstärkt. Die Inkubation der NAv-NP mit biotinylierten Liganden sollte daher ohne Zusatz von Puffersalzen durchgeführt werden. Es ist anzunehmen, dass bei der Biotinylierung des ApoE nicht nur ein Biotin-Rest pro ApoE-Molekül gebunden wurde und es so bei Zugabe der NeutrAvidin®-modifizierte NP zu einer Quervernetzung mehrerer NP über den mehrfach biotinylierten Liganden ApoE kommen konnte.

Die fertige NP-Suspension hatte einen Gehalt von 10 mg/ml NP und eine ApoE Konzentration von 80 µg/ml. Die NP wurden nach der Inkubation zweimal gewaschen und die Überstände für den WB verdünnt. Im Falle, dass der Ligand nicht an die NP gebunden haben sollte, enthält der erste Überstand nach einer Verdünnung von 1 : 4 maximal 20 µg/ml ApoE. Zusätzlich zu dem Überstand wurde das biotinylierte aufgereinigte ApoE in einer 1 : 8 Verdünnung als 100%-Wert im WB untersucht (Endkonzentration 20 µg/ml). Auf diese Weise lassen sich die Überstände später auf der Membran über die optische Dichte der Banden mit dem 100%-Wert des ApoE vergleichen. Zum weiteren Vergleich wurde noch eine Eichgerade des ApoE im Konzentrationsbereich von 5 - 20 µg/ml auf das Gel aufgetragen (Abbildung 11).

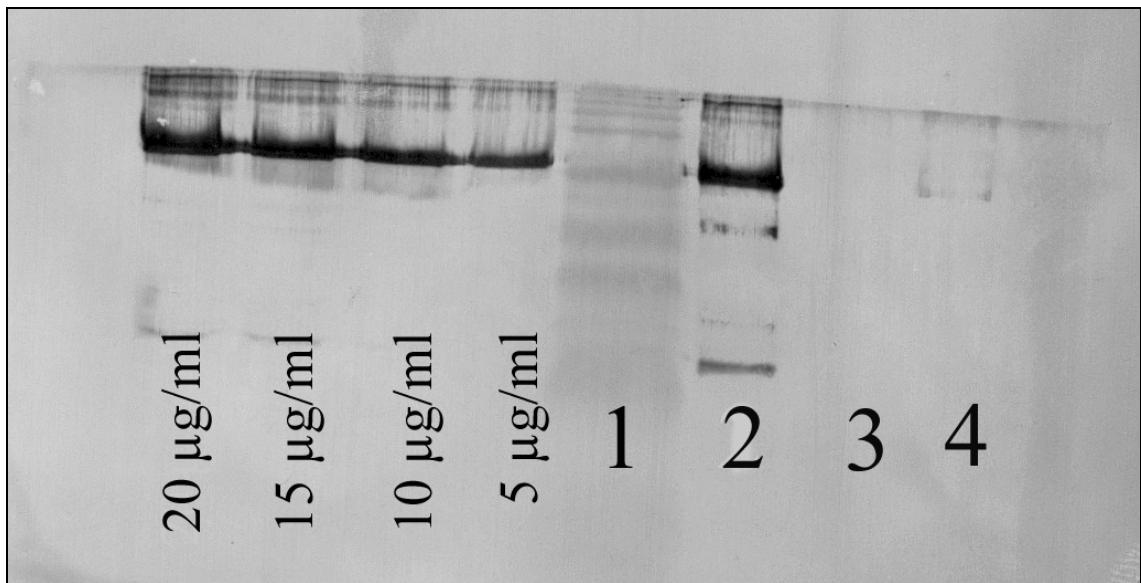


Abbildung 11 Western Blot zum Nachweis der erfolgten ApoE-Biotin Bindung an NAV-modifizierte NP mit:

Eichgerade: 5 - 20 µg/ml ApoE

Lane 1: Größenmarker

Lane 2: ApoE-Biotin (100%-Wert)

Lane 3: erster Überstand der NP

Lane 4: zweiter Überstand nach Aufreinigung der ApoE-NP

Die ApoE-Biotin-Probe (Lane 2) wurde als 100%-Wert für die Überstände der NP-Probe aufgetragen. Zusätzlich sollte untersucht werden, ob bei der Biotinylierung und Aufreinigung des ApoE mit größeren Verlusten des Proteins gerechnet werden muss. Der Gehalt der Probe von Lane 2 wurde auf 20 µg/ml kalkuliert und zeigt, wie in Abbildung 11 zu erkennen ist, eine vergleichbare Bandenintensität wie die Bande der 20 µg/ml Probe in der Eichgerade. Es ist somit festzuhalten, dass bei der Biotinylierung und Aufreinigung des ApoE keine größeren Verluste des Proteins auftraten. Zusätzlich zum rein visuellen Vergleich wurden die durchgeführten WB eingescannt und die Banden auf ihre optische Dichte hin untersucht. Die Auswertung verschiedener Blots zeigte, dass durchschnittlich mehr als 17 µg/ml von den theoretischen 20 µg/ml in der ApoE-Biotin-Probe zu finden waren.

Lane 3 der Abbildung 11 zeigt den ersten Überstand der ApoE-NP. Da keine Bande zu erkennen ist, kann auf eine gute Bindung des ApoE-Biotin an die

NeutrAvidin[®]-modifizierten NP geschlossen werden. In weiteren Blots ließ sich teilweise eine schwache Bande erkennen. Wie bereits im WB zum Biotinylierungsnachweis zu erkennen war, bindet nicht das gesamte zugesetzte ApoE-Biotin an die modifizierten NP. Durchschnittlich lässt sich eine Bindung von etwa 85% festhalten, was bei einer Partikelgröße von 340 nm etwa 3800 ApoE-Molekülen pro HSA-NP entspricht. Bei der Aufreinigung der NP und der damit verbundenen Ultraschall Behandlung wird nochmals ApoE frei, wie an Lane 4 zuerkennen ist. Es ist daher sinnvoll, die ApoE-NP vor Anwendung im Tierversuch nicht mehr aufzureinigen, um so eine möglichst gute Bindung des ApoE an die modifizierten NP zu gewährleisten.

4.2.2.3.2. Biotin-anti-HER2-Antikörper Bindung und Quantifizierung

Für die Herstellung Antikörper-beladener NP wurden 50 µg biotinylierter Antikörper mit 10 mg NeutrAvidin[®]-modifizierten NP inkubiert. Die anti-HER2-Antikörper-beladenen NP wiesen eine Größe von 318 ± 6 nm ($n = 3$) auf. Die NP wurden gewaschen und die erhaltenen Überstände im WB untersucht. Die Konzentration des Partikel-gebundenen Antikörpers wurde über einen Vergleich der Bandenintensität zwischen den Banden der Überstände und den Banden der Eichgerade kalkuliert. Das Ergebnis ist Abbildung 12 zu entnehmen und zeigt eine effektive Bindung des biotinylierten Antikörpers an die NP. Mehr als 4 µg Antikörper konnten im Durchschnitt pro Milligramm NP gebunden werden. Das entspricht einer Menge von 370 Antikörpern pro HSA-NP bei einer Partikelgröße von 320 nm.

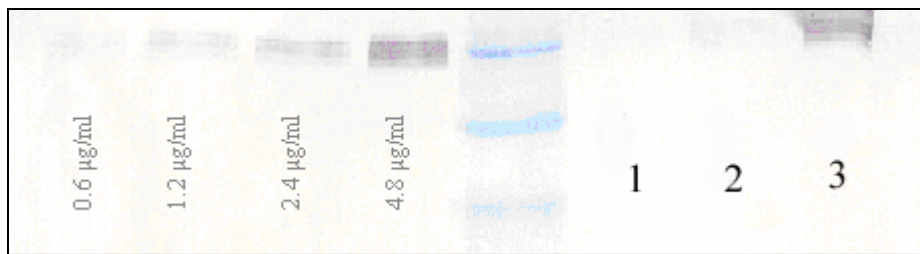


Abbildung 12 Western Blot zum Nachweis der erfolgten Antikörper Bindung

Der WB zeigt in Lane 1, 2 und 3 den dritten, zweiten und ersten Überstand der NP-Aufreinigung. Ein Intensitätsvergleich der Banden mit der Eichgerade ergab

eine Konzentration von etwa 4 µg/ml für den ersten Überstand. Die Bandenintensitäten der folgenden Überstände war aufgrund ihres geringen Antikörpergehalts nicht auswertbar. Damit ergibt sich eine Bindungseffizienz von 87%.

4.3. Herstellung von HSA-NP mit direkt kovalent gebundenem Liganden

Bei der Kopplung von thiolisiertem ApoE an aktivierte HSA-NP wurden NP verwendet, die mit dem PEG-Crosslinker nach der Umkehr-Methode aktiviert wurden. Für die Charakterisierung des fertigen Trägersystems wurde die Bestimmung des gebundenen ApoE an die NP mittels WB verfolgt. Die ApoE-PEG-NP hatten eine Größe von 210 ± 4 nm ($n = 3$). Bei dieser direkten Bindung von ApoE an NP neigt der Ligand nicht dazu mehrere Partikel quervernetzen wie es beim Einsatz von biotinyliertem ApoE vorkommt. Daher kann die Möglichkeit der Aggregatbildung bei der direkten Kopplungsmethode im Gegensatz zur Methode über Bindung an mit NeutrAvidin®-modifizierten NP deutlich reduziert werden.

Die Konzentration des Partikel-gebundenen ApoE wurde über einen Vergleich der Bandenintensität zwischen den Banden der Überstände nach NP-Inkubation und den Banden des ApoE vor bzw. nach Thiolierung kalkuliert. Zusätzlich erfolgte ein Vergleich zu den Banden der Eichgerade. Das Ergebnis wird in der folgenden Abbildung 13 dargestellt.

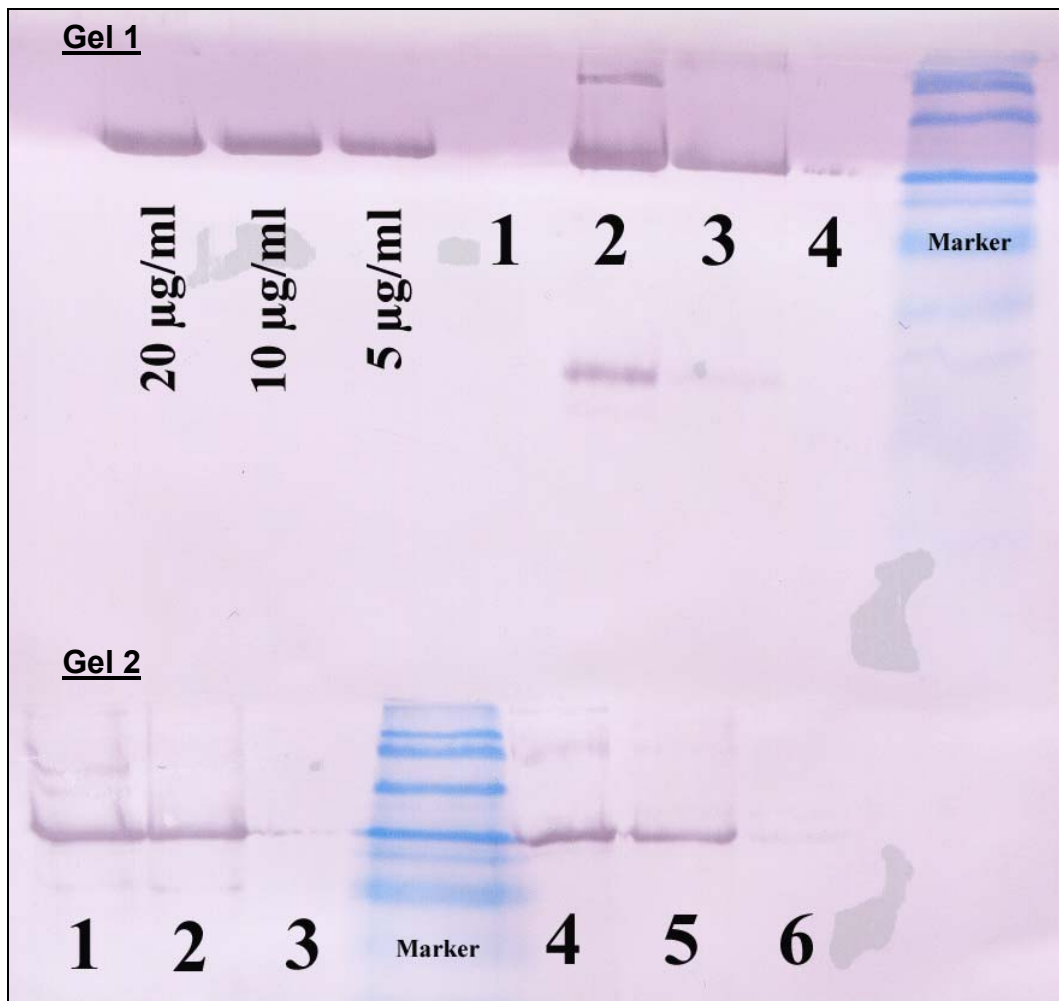


Abbildung 13 Western Blot zum Nachweis der erfolgten ApoE Bindung bei kovalenter Bindung an HSA-NP

Tabelle 9 Bandenzuordnung des Western Blots in Abbildung 13

Gel	Lane	Apolipoprotein
1	Eichgerade	5, 10, 20 µg/ml ApoE Calbiochem
1	1	ApoE Calbiochem nach NP Inkubation
1	2	ApoE2 Arg142Cys vor der Thiolierung
1	3	ApoE2 Arg142Cys nach der Thiolierung
1	4	ApoE2 Arg142Cys nach der NP Inkubation
2	1	ApoE3 vor der Thiolierung
2	2	ApoE3 nach der Thiolierung
2	3	ApoE3 nach der NP Inkubation
2	4	ApoE2 Sendai vor der Thiolierung
2	5	ApoE2 Sendai nach der Thiolierung
2	6	ApoE2 Sendai nach der NP Inkubation

Die Auswertung des WB zeigt eine gute Bindungseffizienz aller Apolipoproteine. Die Banden mit den Proben nach der NP-Inkubation (Gel 1: Lane 1/4; Gel 2: Lane 3/6) zeigen keine bis sehr geringe Bandenintensität. Es ist daher von einer Bindungsrate größer 95% auszugehen. Ein Vergleich der Banden in den Lanes vor und nach Thiolierung mit den beiden Aufreinigungsprozessen zeigt, dass nur geringe Mengen an ApoE3 (Gel 2: Lane 1/2) bzw. ApoE2 Sendai (Gel 2: Lane 4/5) bei diesem Prozess verloren gehen. Im Bereich der ApoE2 Arg142Cys-Probe nimmt die Bandenintensität nach der Thiolierung (Gel 1: Lane 3) im Vergleich zur Bande vor der Thiolierung (Gel 1: Lane 2) deutlicher ab. Die Bindungsrate von 95% muss somit im Fall des ApoE2 Arg142Cys auf die reduzierte Ausgangskonzentration von etwa 60% bezogen werden. Für die Endzubereitung resultiert so eine ApoE-Konzentration von 190 µg/ml für die ApoE3 und die ApoE 2-Probe bei einer Partikelkonzentration von 10 mg/ml. Die ApoE2 Arg142Cys-Probe enthielt 114 µg/ml bei 10 mg/ml NP. Ein Vergleich der Apolipoproteine von Herrn Dr. Hoffmann (Albert-Ludwigs-Universität/Freiburg) mit kommerziell erwerbbaarem ApoE der Firma Calbiochem zeigt, dass es auch bei der NP Inkubation mit thiolisiertem ApoE von Calbiochem (Gel 1: Bande 1) zu einer nahezu 100%-igen Bindung des Liganden an die aktivierten NP kommt.

4.4. ApoE-Biotin/NeutrAvidin®-modifizierten NP vs. ApoE-PEG-NP

Beide Partikelsysteme, ApoE-Biotin/NeutrAvidin®-modifizierten NP und ApoE-PEG-NP, zeigen in ihrer Herstellung und Handhabbarkeit gewisse Vor- und Nachteile.

Die Herstellung der NP mit kovalent gebundenem ApoE baut auf den mit NeutrAvidin®-modifizierten NP gemachten Erfahrungen auf und zeigt gegenüber dem erstentwickelten System Vorteile, wie eine geringere Neigung zur Flockung und eine schnellere Fertigstellung des NP-Systems. Die Weiterentwicklung der ApoE-Biotin/NeutrAvidin®-modifizierten NP zu den ApoE-PEG-NP war jedoch nur aufgrund der erhaltenen Ergebnisse in der Entwicklungsphase der ApoE-Biotin/NeutrAvidin®-modifizierten NP möglich. Bei den zuletzt genannten zeigte sich der Vorteil der schnell austauschbaren Liganden an das NeutrAvidin®-modifizierte NP-System (siehe hierzu auch die Testung von anti-HER2-Antikörper-beladenen NeutrAvidin®-modifizierten NP) sowie das günstigere Verhältnis von eingesetztem Liganden zu gebundenem Liganden. Für die Herstellung der ApoE-PEG-NP wurde im Vergleich zu den ApoE-Biotin/NeutrAvidin®-modifizierten NP die doppelte Menge ApoE eingesetzt. Dieses Vorgehen war für den verkürzten Herstellungsprozess notwendig und führte in der Endzubereitung zu einer höheren Konzentration des ApoE. Dennoch wäre für einen pharmakologischen Effekt eine geringere Beladung wie im Fall der ApoE-Biotin/NeutrAvidin®-modifizierten NP ausreichend (siehe hierzu *in vivo* Daten). Die Neigung zur Flockung der ApoE-NP mit dem Avidin/Biotin-System zeigte sich als größter Nachteil bei der Herstellung der ApoE-Biotin/NeutrAvidin®-modifizierten NP. Beim Biotinylierungsprozess kann eine mehrfache Biotinylierung des ApoE nicht ausgeschlossen werden, was bei der mit den NeutrAvidin®-modifizierten NP zu einer Quervernetzung der Partikel durch das ApoE führen kann. Diese Vernetzung kann bei der kovalenten Bindung des ApoE an die NP deutlich reduziert werden, wodurch stabilere Partikel entstehen als bei der Ligandenbindung über das Avidin/Biotin-System. Weiterer Vorteil der ApoE-PEG-NP ist eine geringere unspezifische Bindung in der Zellkultur. Zusätzlich wird durch die kürzere Herstellungsprozedur der kovalent gebundenen ApoE-PEG-NP das Kontaminationsrisiko mit Keimen und Bakterien im Prozess reduziert, wenn davon ausgegangen wird, dass jeder Modifikationsschritt die Belastung des Systems an sich und die mögliche

Keimbelastung erhöht. Hinzu kommt, dass der PEG-Crosslinker unter GMP-Bedingungen hergestellt wird, wodurch Qualitätsschwankungen, wie sie in Versuchen mit sulfo-MBS festgestellt wurden, ausgeschlossen werden können. Mit dem eingesetzten Crosslinker konnte bei beiden Systemen ein theoretischer Stealth Effekt durch die PEG Kette *in vivo* (Calvo et al., 2001) erreicht werden.

4.5. Loperamid

Das Opioid Loperamid wird oral als peristaltikhemmendes Antidiarrhoikum angewendet und zeigt in dieser Anwendung keine zentral pharmakologische Wirkung, da es die BHS nicht überwinden kann. Daher wirkt Loperamid nicht analgetisch. Gelangt Loperamid jedoch in das Gehirn, so kann es an den Opioidrezeptor binden und analgetisch wirken.

4.5.1. Loperamid-Analytik

Die analytische Untersuchung des Loperamids nach Chen et al. (2000) zeigte eine pH-abhängige Retentionszeit des Loperamids. Bei einem pH Wert von 3,8 lag die Retention des Wirkstoffs bei 12 min. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Auswertung der Integrationsfläche des Loperamids nicht von Albuminresten im Überstand gestört. Das gelöste HSA im Üb wurde mit dem Einspritzpeak eluiert und führte bei pH Werten unter 3,8 zu einem starken Tailing des Einspritzpeaks, was die Auswertung der Integralflächen des Loperamidpeaks stark behinderte. Bei einem konstanten pH Wert von 3,8 konnte jedoch eine Eichgerade im Bereich von 1 - 10 µg/ml aufgenommen und ausgewertet werden.

4.5.2. Loperamid-Beladungsbestimmung

Für die Beladung von NP mit Wirkstoff eignet sich besonders der Einschluss des Wirkstoffs in die Partikelmatrix. Hierdurch kann der eingebundene Stoff nicht nur im NP transportiert werden, sondern auch gleichzeitig vor äußeren Einflüssen geschützt werden.

Eine Einbindung von Loperamid in HSA-NP war aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit und hohen Ethanollöslichkeit des Wirkstoffs nicht möglich. Beim Desolvationsprozess der Albumin-NP mit Ethanol reicherte sich der Wirkstoff bevorzugt im lipophilen Ethanol an, so dass keine effiziente Einbindung in die Partikelmatrix möglich war. Daher musste auf eine adsorptive Bindung ausgewichen werden. Vor der Bindung an HSA-NP wurde das Adsorptionsverhalten von Loperamid an gelöstes HSA in Form einer Adsorptionsisotherme ermittelt. HSA bindet eine Vielzahl unterschiedlicher Substanzen, die in den Blutkreislauf gelangen. Dadurch beeinflusst die Bindung von Arzneistoffen an HSA ihre Pharmakokinetik. Außerdem können Arzneistoffe mit einer hohen Affinität zu HSA effektiv für die Bindung von Arzneistoffen an HSA-NP genutzt werden.

Die erhaltene Adsorptionsisotherme wurde nach Freundlich ausgewertet. Dazu wurde auf der x-Achse die ermittelte Konzentration des nicht-adsorbierten Loperamid aufgetragen und auf der y-Achse der Quotient aus gebundenem Wirkstoffanteil und eingesetzter HSA Menge (x/m).

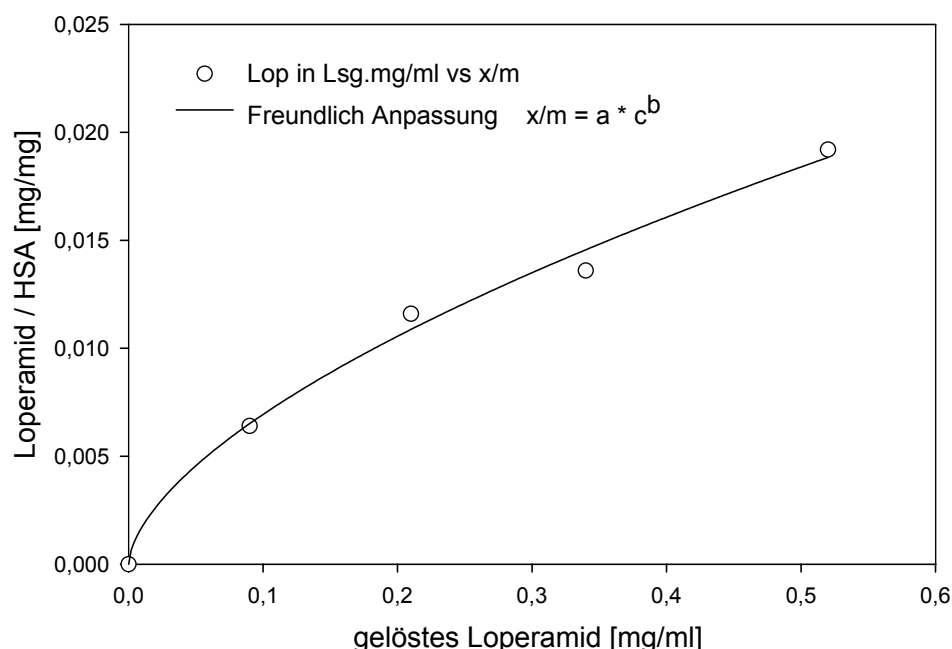


Abbildung 14 Adsorptionsisotherme zur Loperamidbindung an HSA

Wie in Abbildung 14 zu sehen ist, nimmt die Loperamid-Beladung von HSA bei abnehmender Loperamidkonzentration nur geringfügig ab. Daraus leitet sich ab,

dass sich auch bei niedrigen Konzentrationen des Wirkstoffs eine ausreichende Loperamid-Beladung von HSA und damit auch an HSA-NP erzielen lässt.

Für die adsorptive Bindung des lipophilen Loperamids an HSA-NP spielt der Partikelgehalt eine Rolle, je größer das Verhältnis von HSA-NP zu Loperamid, um so mehr Wirkstoff kann an die NP gebunden werden. Daher wurde der gebundene Anteil des Loperamids auf den NP-Gehalt bezogen betrachtet.

Tabelle 10 Übersicht zur Loperamidbindung an modifizierte und nicht modifizierte NP

NP	HSA [mg/ml]	Loperamid [mg/ml]	Bindung [%]	Lop/HSA [µg/mg]
HSA-NP	40	10,0	32,7	81,7
HSA-NP	32	10,0	26,0	81,3
HSA-NP	28	10,0	22,8	81,4
NAv-NP	20	6,6	21,9	72,6
NAv-NP	20	3,3	22,4	36,3

Daraus resultiert beim Einsatz von unmodifizierten NP eine durchschnittliche Bindung von 81 µg Loperamid/mg HSA. Bei der adsorptiven Bindung von Loperamid an NeutrAvidin®-modifizierte NP binden dagegen nur 72,6 µg Loperamid pro Milligramm HSA. Bei einem konstanten Inkubationsverhältnis von 20 mg NeutrAvidin®-modifizierten NP zu 6,6 mg Loperamid bzw. 3,3 mg Loperamid kommt es zu einer prozentualen Bindung von 22%. Eine Präparation mit der Endkonzentration von 10 mg/ml NP enthält somit nach Loperamidinkubation 0,73 bzw. 0,37 mg/ml Wirkstoff. Bei der Bindung von Loperamid an ApoE-PEG-NP wurde von der gleichen Bindungseffizienz (22%) wie bei den NeutrAvidin®-modifizierten NP ausgegangen.

4.6. Zellkultur

4.6.1. Zellaufnahme von ApoE-modifizierten Nanopartikeln

Es wurde die Aufnahme verschiedener NP Präparationen mittels CLSM in Hep G2-Zellen und β .End3-Zellen untersucht. Die Hep G2-Zellen sind epitheliale Zellen eines humanen Leberkarzinoms. Für die Zelllinie konnte der LDLR (Owen et al., 2004) und der LRP (Beisiegel et al., 1989) nachgewiesen werden. Bei den β .End3-Zellen handelt es sich um immortalisierte Hirnendothelzellen der Maus. Für diese Zelllinien konnten endothelspezifische Proteine und Carrier-vermittelte Transportersysteme nachgewiesen werden (Omidi et al., 2003). Zusätzlich wurde das Vorkommen des LDLR vor Verwendung der Zelllinie im Zellversuch nachgewiesen.

Die CLSM-Aufnahmen von ApoE-modifizierten NP mit Hep G2-Zellen zeigten im Vergleich zur NP Kontrolle ohne ApoE eine Anreicherung der NP an bzw. in den Zellen. In den abgebildeten CLSM-Aufnahmen (Abbildung 15) mit Hep G2-Zellen sind in Bild **A** die ApoE-PEG-NP (FITC-Kanal) zu sehen, in Bild **B** die Membranfärbung (TRITC-Kanal) und in Bild **C** die Überlagerung der beiden Kanäle. Wie in dem Bild mit der Überlagerung zu erkennen ist, zeigt sich die Tendenz einer Anlagerung der NP an die Membran, teilweise lässt sich sogar eine Aufnahme der NP in die Zellen erkennen.

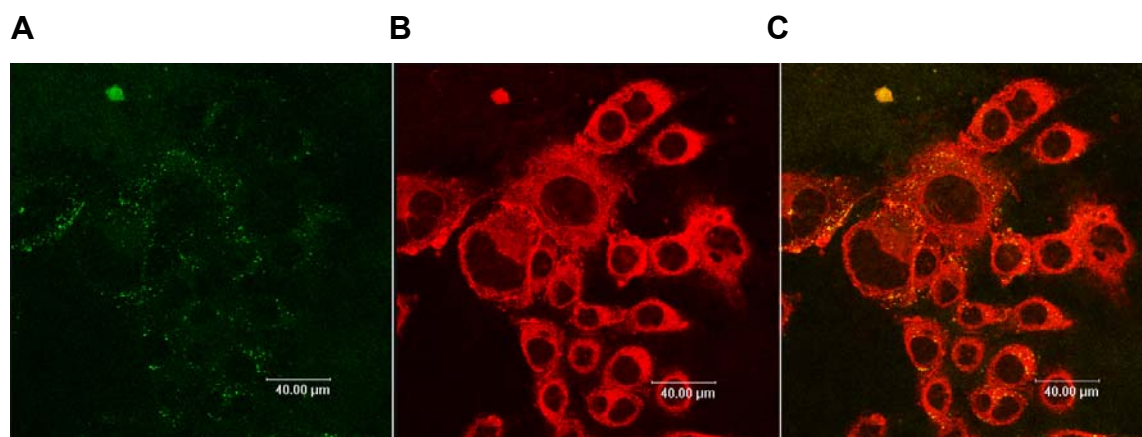


Abbildung 15 CLSM-Aufnahme von ApoE-PEG-NP (250 µg/ml) in Hep G2-Zellen nach einer Inkubationszeit von 4 Std.

A: FITC-Kanal; **B:** TRITC-Kanal; **C:** Überlagerung der Kanäle aus A und B.

Für die Kontrollen des Versuchs wurden Hep G2-Zellen mit unmodifizierten HSA-NP und mit dem PEG-Crosslinker modifizierte NeutrAvidin®-NP untersucht. Wie in der Überlagerung von FITC- und TRITC-Kanal (Abbildung 16) zu sehen ist, zeigen die Kontrollen weniger bis keine Anlagerung der NP an die Zellen.

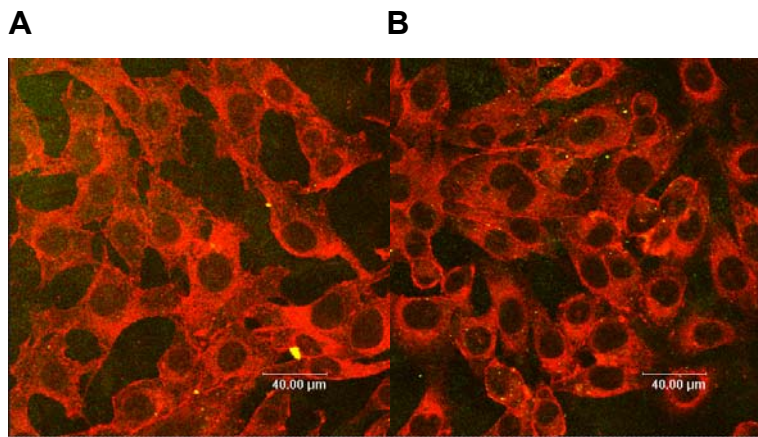


Abbildung 16 **A:** CLSM-Aufnahme (Überlagerung der FITC- und TRITC- Kanäle) von HSA-NP (250 µg/ml) in Hep G2-Zellen nach einer Inkubationszeit von 4 Std.
B: CLSM-Aufnahme (Überlagerung der FITC- und TRITC- Kanäle) von NAv-PEG-NP (250 µg/ml) in Hep G2-Zellen nach einer Inkubationszeit von 4 Std.

Es konnte in Wiederholungsversuchen mit ApoE-modifizierten NP keine eindeutige Aufnahme der NP in die Zellen gezeigt werden. Bei den entsprechenden Kontrollen konnte die unspezifische Bindung der NP nicht deutlicher, als in Abbildung 16 zu sehen ist, ausgeschlossen werden. Es kann nach den durchgeführten Versuchen somit nur von einer Tendenz der Aufnahme von modifizierten NP gesprochen werden.

Die CLSM-Aufnahmen mit β .End3-Zellen zeigten etwas deutlichere Ergebnisse als die Aufnahmen mit den Hep G2-Zellen. Bei den ApoE-PEG-NP ließ sich eine Akkumulation der NP an der Membranoberfläche der Zellen erkennen. Das Bild **A** in Abbildung 17 zeigt eine Überlagerung einer Aufsicht auf eine Zelle im Durchlicht sowie der CLSM-Aufnahme mit Akkumulation von ApoE-PEG-NP auf der Zellmembran bei 488 nm. Die mittlere Aufnahme (**B**) ist ebenfalls eine Überlagerung einer Durchlichtaufnahme und einer CLSM-Aufnahme. Es handelt

sich um einen Schnitt durch die gleiche Zelle wie in Aufnahme **A**, wobei keine Akkumulation der NP in der Zelle zu sehen ist. Im letzten Bild **C** (Laser: 543 nm) wird die intakte Zellmembran mittels Trypanblau-Färbung gezeigt.

Die beiden untersuchten Konzentrationen von 100 bzw. 1000 µg/ml zeigten keinen Unterschied in der Bindung an der Oberfläche, auch die beiden Inkubationszeiträume von 1 bzw. 3 Std führten zu keinem veränderten Bild. Es konnte bei keiner untersuchten Präparation eine Akkumulation in den Zellen beobachtet werden. Die Kontrollen mit NeutrAvidin[®]-modifizierten NP führte weder bei der einstündigen noch bei der dreistündigen Inkubation zu einer Anreicherung der Partikel an oder in den Zellen. Auch die Inkubation mit verschiedenen NP-Konzentrationen zeigte keine Bindung der Partikel an die Membran bzw. Akkumulation in den Zellen. In Abbildung 18 ist eine der durchgeführten Kontrollen abgebildet. Bild **A** zeigt die Aufsicht auf eine Zelle, um die Zelle herum sind diffus verteilt größere Partikel zu erkennen, eine Anlagerung von NP läßt sich trotz der hohen Signalverstärkung auf der Membran nicht erkennen.

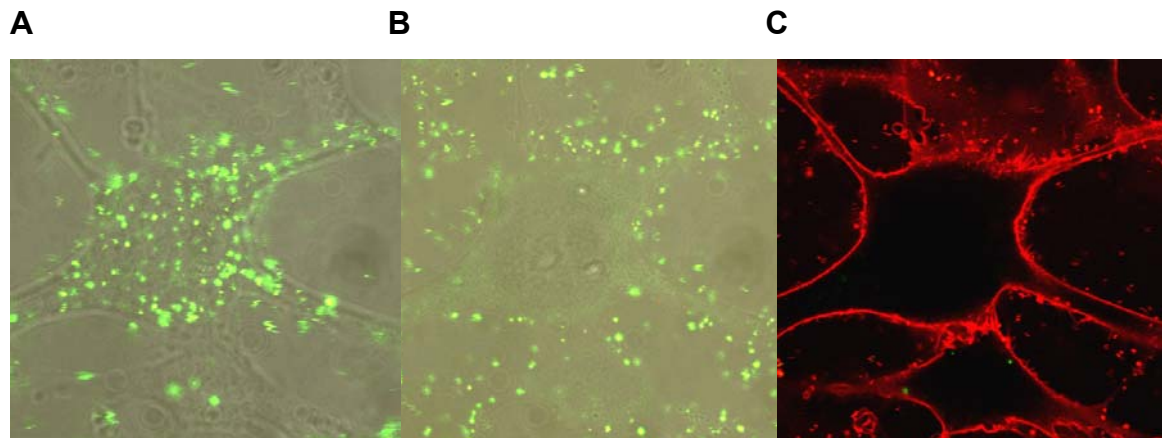


Abbildung 17 CLSM-Aufnahme von ApoE-PEG-NP (100 µg/ml) in β.End3-Zellen nach einer Inkubationszeit von 1 Std.

A: obere Zellebene (Membran) als Überlagerung von CLSM-Aufnahme und Durchlicht; **B:** Zellmitte als Überlagerung von CLSM-Aufnahme und Durchlicht; **C:** Zellmitte mit Trypanfärbung

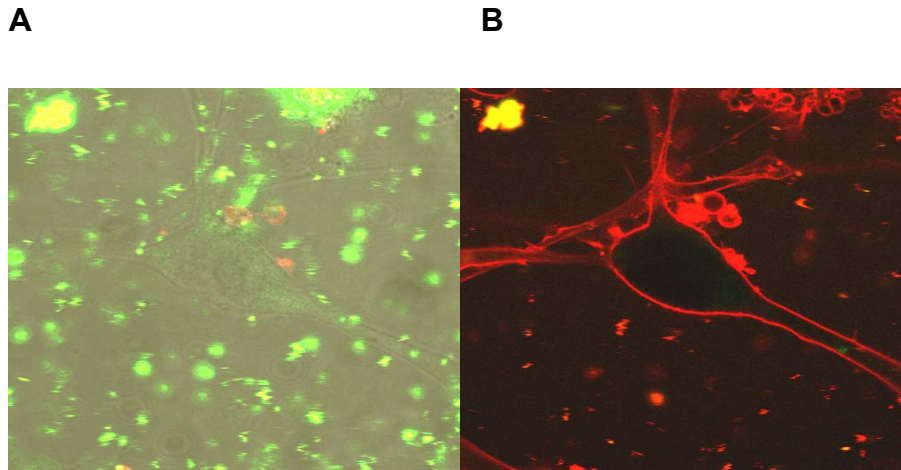


Abbildung 18 CLSM-Aufnahme von NeutrAvidin[®]-modifizierten NP (1000 µg/ml) in β.End3-Zellen nach einer Inkubationszeit von 1 Std.

A: obere Zellebene (Membran) im Durchlicht; **B:** Zellmitte mit Trypanfärbung

Zusammengefasst kann festgehalten werden, dass die CLSM-Studie mit Hep G2-Zellen im Vergleich zu den Kontrollen eine schwache Anreicherung der mit ApoE-modifizierten NP im Zellinneren zeigt und die Studie mit β.End.3-Zellen eine deutlichere Anreicherung an der Membran aufweist. Um die Aufnahme der Partikel mit Sicherheit als spezifisch einzuordnen bzw. auf einen bestimmten Rezeptor eingrenzen zu können, sind noch weitere Studien notwendig. Eine Möglichkeit wäre die selektive Blockade von Rezeptoren durch spezifische Antikörper. Auf diese Weise ließe sich zeigen, ob ein Rezeptor der Lipoprotein-Rezeptorfamilie und wenn ja welcher der Rezeptoren für die spezifische Bindung der ApoE-PEG-NP verantwortlich ist.

Neben der Untersuchung der Zellaufnahme von NP im CLSM wurden FACS-Studien durchgeführt. Die Studien erbrachten kein reproduzierbares Ergebnis. Die Untersuchungen zur Bindung von ApoE-PEG-NP und PEG-modifizierten NP zeigten neben der nicht reproduzierbaren Rezeptordichte des LDLR auf den Hep G2-Zellen starke Schwankungen in der Bindungsaffinität der NP an die Zellen. In Abbildung 19 werden die Bindungsergebnisse einer Studie dargestellt. Verwendet wurden hierbei Hep G2-Zellen mit einer Rezeptordichte des LDLR von 52%. Neben den untersuchten ApoE-PEG-NP (**G**) wurden Negativkontrollen mitgeführt. Bei den Kontrollen wurden zum einen Zellen ohne NP untersucht (**C**), so wie Zellen mit unmodifizierten HSA-NP (**D**)

und mit PEG-Crosslinker modifizierten NP (**E;F**). Wie im Balkendiagramm zu erkennen, zeigte die Negativkontrolle ohne NP (**C**) für die Auswertung keine störende Fluoreszenz im untersuchten TRITC Bereich. Ein Vergleich der prozentualen Bindung mit ApoE-PEG-NP an Hep G2-Zellen mit der Kontrolle ohne ApoE (**E;F**) zeigt eine leichte Erhöhung der ligandengekoppelten NP an die Zellen. Bei der Untersuchung zur Bindung der PEG-modifizierten NP ohne Ligand an Zellen zeigten nach 4 Std Inkubation 1,7 bzw. 3,6% der Zellen unspezifische Bindung, während bei den ApoE-PEG-NP nach dem selben Zeitraum 11,5% der Zellen NP gebunden hatten. Es kann somit festgehalten werden, dass unmodifizierte HSA-NP zu einer starken unspezifischen Adsorption neigen. Diese Anlagerung an die Zellmembran kann durch die Einführung hydrophiler Polyethylenglycol-Ketten verhindert werden. ApoE-modifizierte NP wiederum zeigen eine erhöhte Bindung an die Membran von Zellen, was auf eine Wechselwirkung zwischen Ligand und Rezeptor hinweisen kann. Durch die Heterogenität der insgesamt mit diesem Zellsystem durchgeführten Versuche konnte, wie bereits in der Diskussion der CLSM-Versuche angemerkt wurde, der Mechanismus nicht abschließend geklärt werden. Die vorliegenden Ergebnisse der FACS-Studien lassen zwar weiterhin die Vermutung zu, dass ApoE-modifizierte NP zu einer Anlagerung und eventuell zu einer Aufnahme in die Zellen durch Interaktion mit einem Rezeptor der Lipoprotein-Rezeptorfamilie fähig sind. Ein schlüssiger Beweis konnte jedoch durch die vorliegenden Ergebnisse nicht erbracht werden. Es müssen wie auch bei den CLSM-Studien weitere Versuche durchgeführt werden. Es sollten Versuche mit konstanter Zell- und Rezeptordichte vorgenommen werden, sowie beispielsweise Versuche mit selektiver Blockade der Lipoprotein-Rezeptoren durch geeignete Antikörper.

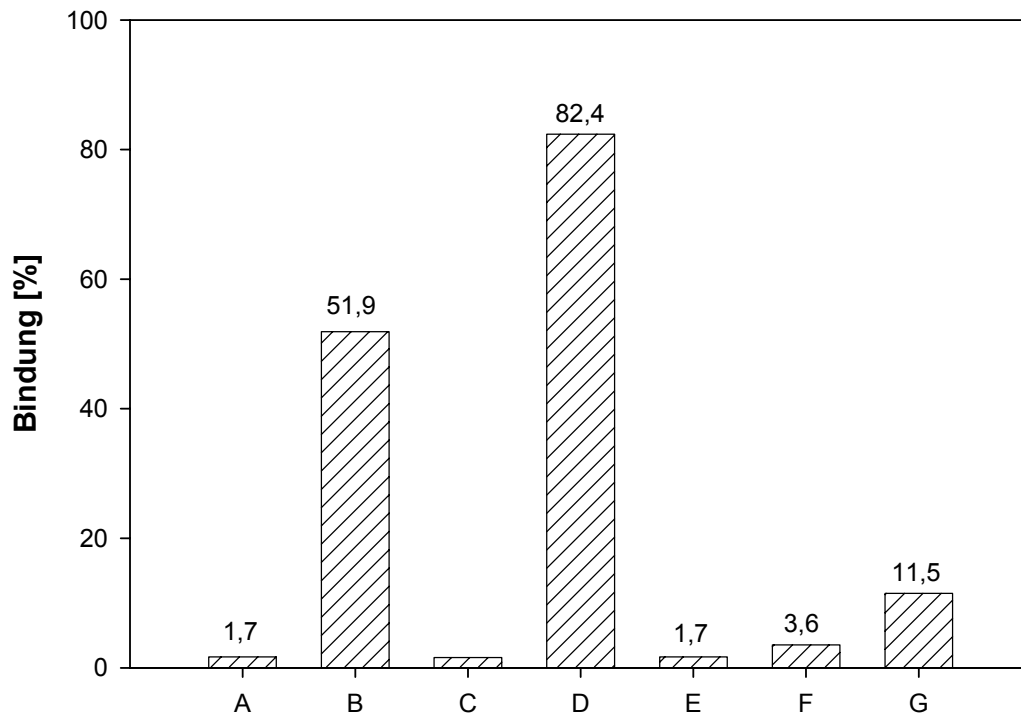


Abbildung 19 Bindungseffizienz von NP an Hep G2-Zellen (Inkubationszeit: 4 Std)

A: unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers; **B:** LDL-R; **C:** Kontrolle;
D: HSA-NP; **E:** PEG-NP 50-fach; **F:** PEG-NP 100-fach; **G:** ApoE-PEG-NP

4.6.2. Zellaufnahme von Antikörper-beladenen Nanopartikeln

4.6.2.1. Zellspezifische Bindung von Antikörper-beladenen NP

Es wurde die Aufnahme von anti-HER2-Antikörper-beladenen und unbeladenen NeutrAvidin[®]-modifizierten NP mittels FACS-Analyse untersucht. Die Versuche wurden in SK-Br-3-, BT474- und MCF7-Zellen durchgeführt. Alle drei verwendeten Zelltypen exprimieren auf ihrer Membranoberfläche den HER2-Rezeptor. An diesen Rezeptor können die ligandengekoppelten NP über den Antikörper anti-HER2 binden und anschließend in die Zelle internalisiert werden. Die MCF7-Zelllinie zeigte eine normale Expression des HER2-Rezeptors (Lewis et al., 1993). Daher wurde die HER2-Expression dieser Zelllinie als 100%-Wert betrachtet. Im Vergleich zu der Expression der MCF7-Zellen ergaben sich nach einer WB-Analyse HER2-Expressionswerte für die überexprimierenden Zelllinien SK-Br-3 und BT474 von 370% und 310%.

Die nach der dreistündigen Inkubation mit den NP erhaltenen Daten werden in der untenstehenden Grafik (Abbildung 20) dargestellt. Die höchste NP Bindung wurde in SK-Br-3-Zellen erzielt (85%). In BT474-Zellen fiel die Partikelbindung etwas niedriger (60%) aus, während in MCF7-Zellen keine spezifische Bindung beobachtet werden konnte. Die beobachteten Bindungen korrelieren mit der HER2-Expression der einzelnen Zelllinien.

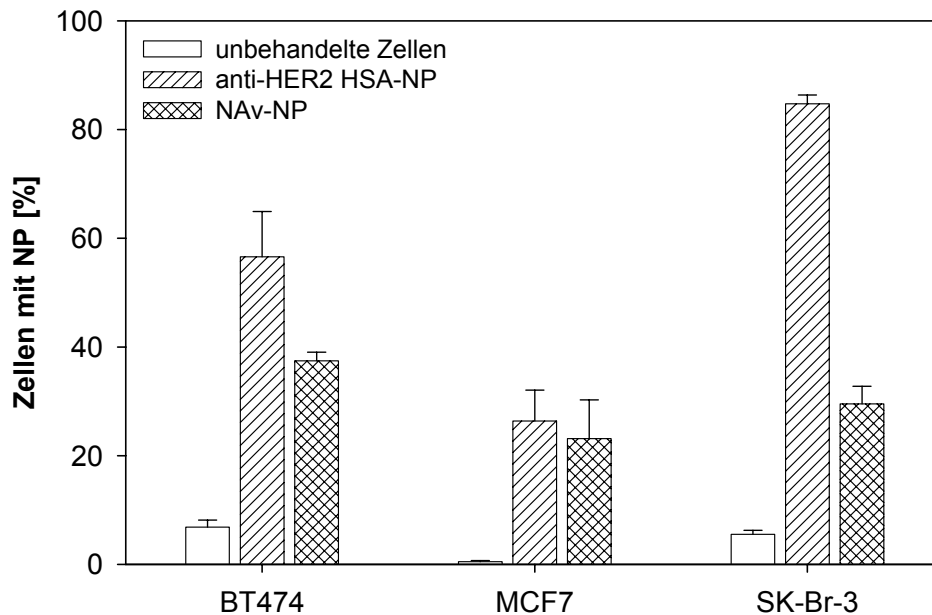


Abbildung 20 Bindungseffizienz von NP an verschiedene HER2 überexprimierende Zelllinien: Ergebnisse der FACS-Analyse von BT474-, MCF7- und SK-Br-3-Zellen. Die Zellen wurden für 3 Std mit 100 µg/ml Antikörper-modifizierten und unmodifizierten NAv-HSA-NP inkubiert (n = 4).

Die unspezifische Bindung der NeutrAvidin[®]-modifizierten NP fällt je nach Zelltyp sehr unterschiedlich aus. Bei den MCF7-Zellen ist im Vergleich zur relativ geringen Bindung der Antikörper-beladenen NP eine hohe Bindung der unbeladenen NP zu erkennen. Bei den SK-Br-3-Zellen zeigte sich dagegen ein deutlicher Unterschied zwischen der Bindung von Antikörper-beladenen und unbeladenen NP.

Zusätzlich zum Vergleich der Bindung von Antikörper-beladenen und unbeladenen NP an Zellen wurde mit den SK-Br-3-Zellen ein Versuch mit Vorinkubation durch einen anti-HER2-Antikörper (Trastuzumab) durchgeführt (siehe Abbildung 21). Der Antikörper sollte dabei die HER2-Rezeptoren

blockieren und so im Falle einer spezifischen Bindung zu einer verringerten Aufnahme der anti-HER2-Antikörper-beladenen NP führen. Die Versuchsauswertung zeigte deutlich, dass die Bindung der Antikörper-beladenen und unbeladenen NP nach der Vorinkubation in gleichem Maße erfolgte, wie die Bindung mit unbeladenen NP ohne Vorinkubation. Die Antikörper-beladenen NP banden ohne Vorinkubation deutlich an die Zellen. Somit kann von einer erfolgreichen Blockade der Rezeptoren durch die Vorinkubation ausgegangen und eine spezifische Bindung von Antikörper-beladenen NP an die Zellen angenommen werden.

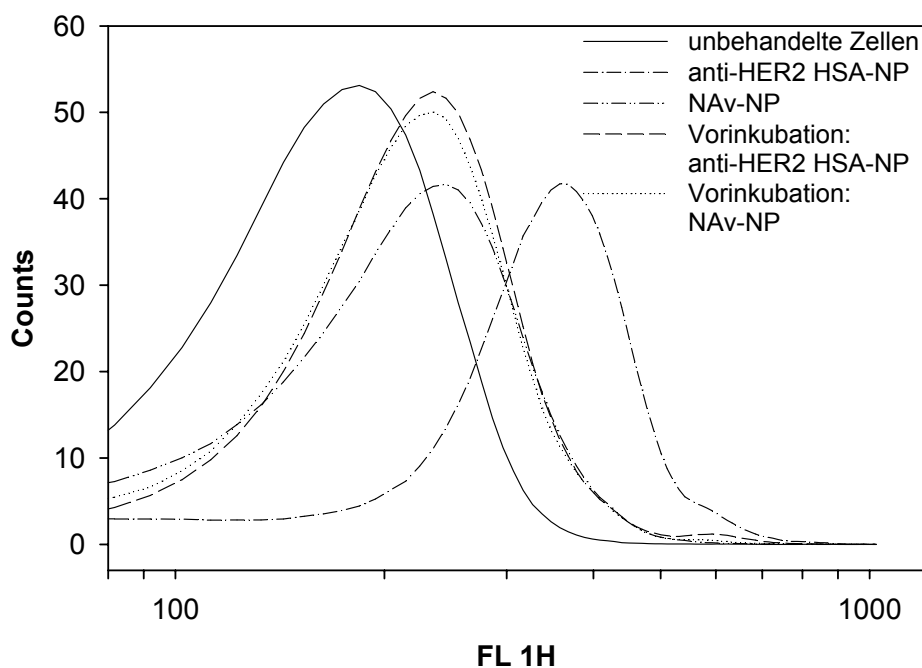


Abbildung 21 FACS-Analyse zur spezifischen Aufnahme von NP:
Vergleich der zellulären Bindung von Antikörper-modifizierten und unmodifizierten NAv-HSA-NP (100 µg/ml) mit und ohne Vorinkubation mit Trastuzumab 2,5 µg/ml.

4.6.2.2. Kinetikstudie zur NP Aufnahme

Für die Kinetikstudie wurde die Aufnahme der Antikörper-beladenen und unbeladenen NP mit und ohne Vorinkubation mit Trastuzumab in SK-Br-3-Zellen untersucht. Die Aufnahme wurde über einen Zeitraum von 3 Std beobachtet. In Abbildung 22 werden die Ergebnisse dargestellt, dabei wird die Bindungsrate gegen die Zeit aufgetragen. Die Akkumulation von beladenen und unbeladenen NP in den Zellen nimmt innerhalb des untersuchten Zeitraums zu,

wobei die Bindung der Antikörper-beladenen NP ohne Vorinkubation deutlich höher liegt (85%) als die Bindung der unbeladenen NP bzw. die Bindung der NP bei Vorinkubation (unter 40%). Die Vorinkubation der Zellen durch anti-HER2-Antikörper scheint die spezifische Bindung der beladenen NP zu inhibieren, wodurch nur noch eine Bindungsrate vergleichbar der unbeladenen NP auftritt.

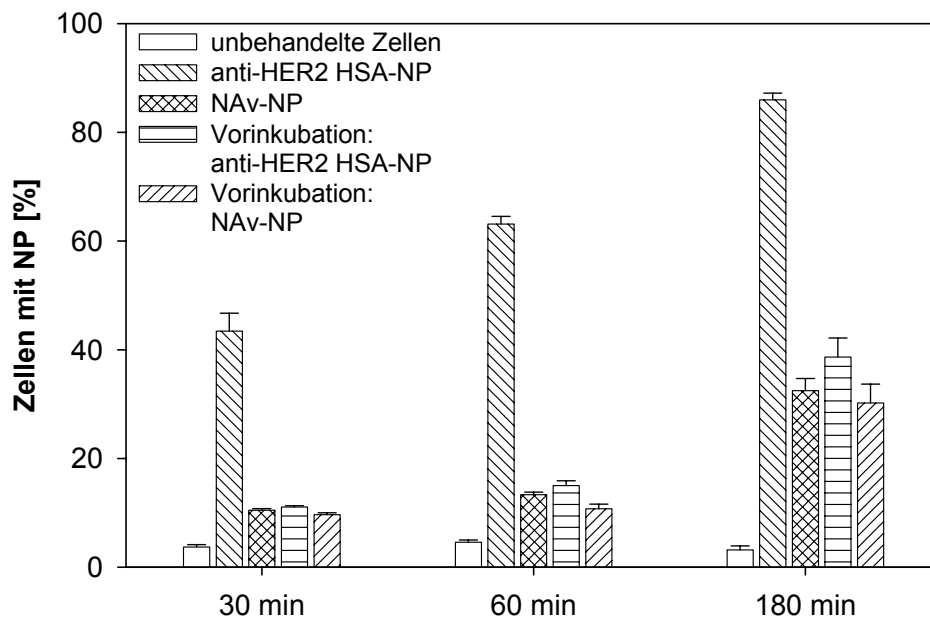


Abbildung 22 Kinetikstudie zur zeitabhängigen Partikelbindung an SK-Br-3-Zellen nach verschiedenen Inkubationszeiten (30, 60 und 180 min; n = 4). Die Zellen wurden mit 100 µg/ml HSA-NP inkubiert.

4.6.2.3. CLSM-Untersuchung in SK-Br-3-Zellen

Mit Hilfe der CLSM-Aufnahmen sollte gezeigt werden, dass die anti-HER2-Antikörper-beladenen NP nicht nur spezifisch an der Tumorzellmembran binden, sondern in die Zellen aufgenommen werden. Dazu wurde die Internalisierung und Verteilung von anti-HER2-Antikörper-beladenen NP in SK-Br-3-Zellen untersucht. Die Bilder in Abbildung 23 zeigen Aufnahmen nach einer Inkubationszeit von 1 Std (A) und 3 Std (B). Nach einer Stunde können NP an der Zellmembran nachgewiesen werden, nach weiteren 2 Std zeigen sich NP Spots innerhalb der Zellen. Die CLSM-Aufnahmen unterstreichen mit ihrer zeitabhängigen Veränderung nochmals das Ergebnis der Kinetikstudie.

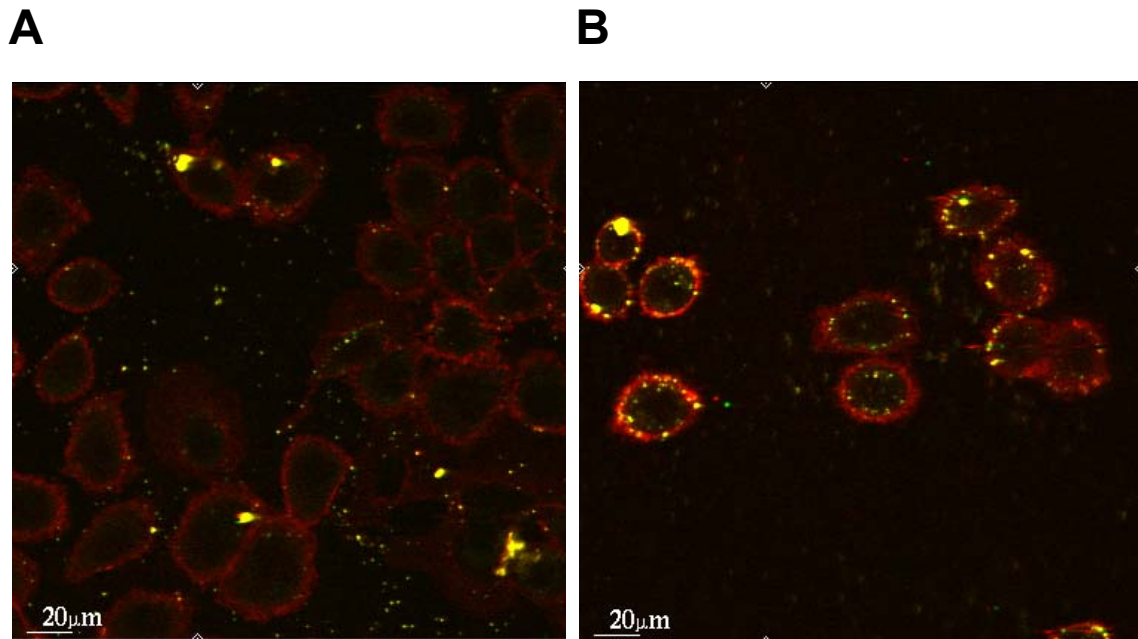


Abbildung 23 CLSM-Aufnahmen zur intrazellulären Verteilung von anti-HER2-Antikörper-NP (grün) in SK-Br-3-Zellen (rot). Nach einer Inkubationszeit von **A** 1 Std und **B** 3 Std. Die Zellen wurden mit 100 μg/ml NP behandelt.

4.7. In vivo Untersuchungen

4.7.1. Versuch A mit ApoE-Biotin / NeutrAvidin®-modifizierten NP

Die Ergebnisse zu den Untersuchungen der NeutrAvidin®-modifizierten NP-Proben mit und ohne ApoE-Liganden werden in der unten stehenden Tabelle aufgeführt und in der darunter liegenden Grafik (Abbildung 24) dargestellt. Für den Versuch wurde ApoE (Mischung aller vorkommenden Isoformen) von Calbiochem verwendet. Die Auswertung des Tierexperiments ergab stark analgetische Effekte, hohe MPE-Werte, bei den Probenzubereitungen 1 - 3. Die Kontrollen (4 - 6) zeigten keinerlei signifikante Effekte und wurden aufgrund einer geringeren Belastung für die Tiere auf einen Zeitraum von 60 min beschränkt.

Tabelle 11 Erhaltene MPE-Werte zum Tierversuch A:

Behandelt wurden ICR-Mäuse mit ApoE-Biotin / NeutrAvidin®-modifizierten NP (n = 8). Die Tiere wurden nach der Injektion mittels Tail-Flick-Apparat zu den Zeitpunkten 15, 30, 45, 60, 90 und 120 min untersucht.

	MPE% ±S.D.	MPE% ±S.D.	MPE% ±S.D.	MPE% ±S.D.	MPE% ±S.D.	MPE% ±S.D.
Zeitpunkt	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6
15 min	100,0 ± 0,0	92,4 ± 16,1	100,0 ± 0,0	10,0 ± 8,0	22,8 ± 24,6	-1,5 ± 9,1
30 min	97,5 ± 4,9	70,4 ± 31,8	100,0 ± 0,0	5,2 ± 6,8	11,5 ± 33,1	-5,4 ± 9,4
45 min	97,0 ± 8,0	53,9 ± 33,7	100,0 ± 0,0	2,7 ± 8,0	4,5 ± 16,2	-4,5 ± 9,3
60 min	100,0 ± 0,0	36,0 ± 30,6	80,0 ± 21,3	1,9 ± 6,6	5,2 ± 16,6	4,7 ± 10,2
90 min	69,8 ± 40,3	24,7 ± 24,0	42,4 ± 32,0			
120 min	35,5 ± 45,2	10,4 ± 18,2	20,5 ± 18,7			

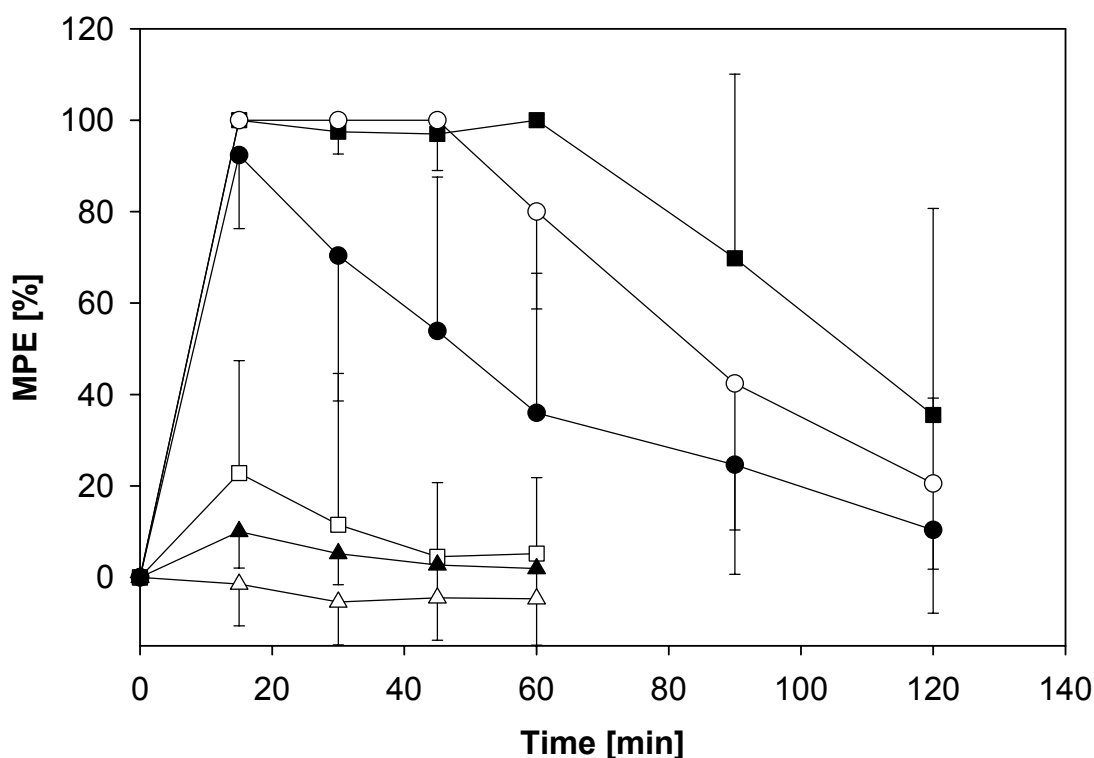


Abbildung 24 Antinocizeptive Effekt nach i.v. Gabe im Tierversuch A:

Behandelt wurden ICR-Mäuse mit ApoE-Biotin / NeutrAvidin®-modifizierten NP (n = 8). Die Tiere wurden nach der Injektion mittels Tail-Flick-Apparat zu den Zeitpunkten 15, 30, 45, 60, 90 und 120 min untersucht.

- | | | |
|---|--|---------|
| ■ | ApoE-HSA-NP mit 7,0 mg/kg Loperamid | Probe 1 |
| ● | ApoE-HSA-NP mit 4,0 mg/kg Loperamid | Probe 2 |
| ○ | Polysorbat 80-gecoatete HSA-NP mit 7,0 mg/kg Loperamid | Probe 3 |
| ▲ | Loperamid-Lösung | Probe 4 |
| □ | HSA-NP mit Loperamid (ohne ApoE) | Probe 5 |
| △ | ApoE-HSA-NP ohne Loperamid | Probe 6 |

Die Tiere, welche loperamidhaltige ApoE-NP erhalten hatten, wirkten innerhalb der ersten 10 min nach Applikation leicht sediert und zeigten bei den Messungen über einen längeren Zeitraum eine langsamerer Reaktion auf den Schmerzreiz. Die Wirkung war bereits beim ersten erfassten Zeitpunkt von 15 min messbar. Bei den mit Probe 1 behandelten Mäusen hielt die analgetische Wirkung über 60 min an und lag bei einem MPE-Wert von beinahe 100%, nahm dann in den folgenden 60 min ab. Mit Probe 2 behandelte Mäuse erreichten im Schnitt einen MPE-Wert von 92%, der dann bereits nach 30 min

und bis zum 2 Std Zeitpunkt abnahm. Ein Vergleich der analgetischen Wirkung von Probe 1 und 2 zeigt, dass die geringere Wirkstoffkonzentration des Loperamids in der Probe 2 zu einer schwächeren analgetischen Wirkung führte. Mäuse der Behandlungsgruppe mit Probe 3 stellen eine Positiv-Kontrolle dar. Wie bereits in der Einleitung angesprochen, zeigten Versuche mit Acrylat-NP mit Tensid-Coating eine analgetische Wirkung mit den Wirkstoffen Dalargin (Alyautdin et al., 1995) und Loperamid (Alyautdin et al., 1997). Auch in dem hier durchgeführten Versuch mit HSA-NP und Tensid-Coating konnte gezeigt werden, dass ein Tensid-Coating bei HSA-NP zum Transport eines Wirkstoffs über die BHS führt. Die Wirkung lag zu den gemessenen Zeitpunkten bis 45 min bei 100% und nahm dann bis zum Zeitpunkt von 120 min ab.

Bei Kontrolle 4 handelt es sich um die reine Wirkstofflösung. Die Mäuse zeigten nach der Applikation kein verändertes Verhalten und die Zubereitung führte bei den Tieren zu keinem veränderten Schmerzempfinden. Die mit HSA-NP ohne ApoE aber mit Loperamid behandelten Tiere (Probe 5) zeigten keine signifikante Schmerzreduktion. Die MPE-Werte waren nach 15 min nur leicht erhöht und lagen bei 23%, auch das Verhalten der Tiere ließ auf keine Loperamidwirkung schließen. Die letzte behandelte Gruppe (Probe 6) sollte eine Veränderung des Schmerzverhaltens seitens der Mäuse durch die reine Partikelzubereitung ausschließen. Die erhaltenen Daten zeigen das unveränderte Schmerzempfinden der Tiere innerhalb des gemessenen Zeitraums von 60 min.

Zusammengefasst läßt sich über die *in vivo* Testung folgende Aussage treffen: Der durchgeführte Versuch zeigt einen Transport von Loperamid mittels ApoE-beladener NP über die BHS. Die Wirkung ist konzentrationsabhängig, bei niedrigerer Wirkstoffbeladung der ApoE-beladenen NP fällt die Reaktionsverlangsamung der Tiere auf den Schmerzreiz geringer aus. Der Transport über die BHS ist ohne den Liganden ApoE in den untersuchten Zubereitungen nicht möglich, bei dem Versuch mit HSA-NP ohne ApoE konnte keine deutliche Schmerzreduktion nach der Proben-Injektion gemessen werden.

4.7.2. Versuch B mit ApoE-PEG-NP

Die Ergebnisse zu den Untersuchungen mit ApoE-PEG-NP werden in Tabelle 12 aufgeführt und in der darunter liegenden Grafik (Abbildung 25) dargestellt. Bei dem eingesetzten ApoE handelte es sich um drei verschiedene Modifikationen des Apolipoprotein E (ApoE3, ApoE2 Sendai und ApoE2 Arg142Cys). Die Apolipoproteine wurden von Herrn Dr. Hoffmann (Albert-Ludwigs-Universität/ Freiburg) hergestellt und im Vorfeld auf ihre Bindung an LDL-Rezeptoren untersucht. Beim Apolipoprotein E3 handelt es sich um ein 34 200 Da schweres Protein, welches unter den drei vorkommenden Varianten (E2, E3, E4) des ApoE im humanen Organismus am häufigsten auftritt. Bei den Modifikationen Sendai und Arg142Cys des ApoE2 wurden jeweils im rezeptorbindenden Bereich (Rezeptor-Bindungsdomäne: Aminosäuren 136 - 150) Aminosäuren verändert. ApoE2 Sendai zeigt einen Austausch von Arginin gegen Prolin an Position 145 und ApoE2 Arg142Cys einen Austausch von Arginin gegen Cystein an Position 142. Die veränderten Apolipoproteine zeigen im Vergleich zu ApoE3 eine um 95% reduzierte Bindung an die Rezeptor-Bindungsdomäne des LDL-Rezeptors (Hoffmann et al., 2001). Für den Versuch wurden die ApoE-Derivate kovalent über einen PEG-Crosslinker nach der Umkehr-Methode an HSA-NP gebunden. Durch die Verwendung der Isoformen sollte versucht werden, der Aufklärung des Transportmechanismus näher zu kommen.

Tabelle 12 Erhaltene MPE-Werte zum Tierversuch B:

Behandelt wurden ICR-Mäuse mit ApoE-PEG-NP (n = 8). Die Tiere wurden nach der Injektion mittels Tail-Flick-Apparat zu den Zeitpunkten 15, 30, 45, 60, 90, 120 und 180 min untersucht.

	MPE% \pm S.D.	MPE% \pm S.D.	MPE% \pm S.D.
Zeitpunkt	Probe 1	Probe 2	Probe 3
15 min	100,0 \pm 0,0	24,1 \pm 12,8	14,3 \pm 6,5
30 min	100,0 \pm 0,0	14,3 \pm 9,2	26,6 \pm 33,3
45 min	87,7 \pm 24,8	10,6 \pm 11,2	20,6 \pm 29,1
60 min	80,7 \pm 35,7	8,7 \pm 5,9	14,4 \pm 11,8
90 min	66,8 \pm 38,4		8,7 \pm 9,4
120 min	32,3 \pm 23,3		5,9 \pm 2,8
180 min	14,7 \pm 11,9		

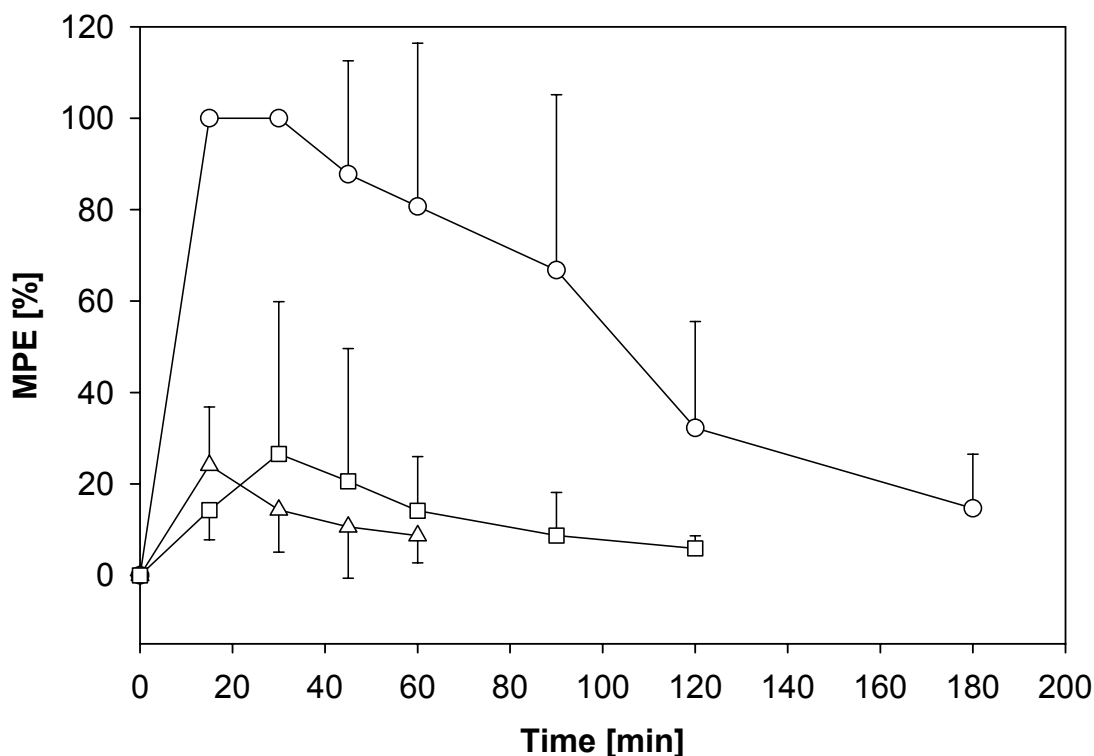


Abbildung 25 Antinocizeptive Effekt nach i.v. Gabe im Tierversuch B:

Behandelt wurden ICR-Mäuse mit ApoE-PEG-NP (n = 8). Die Tiere wurden nach der Injektion mittels Tail-Flick-Apparat zu den Zeitpunkten 15, 30, 45, 60, 90, 120 und 180 min untersucht.

- ApoE3-PEG HSA-NP mit 7,0 mg/kg Loperamid Probe 1
- ApoE2 Sendai-PEG HSA-NP mit 7,0 mg/kg Loperamid Probe 2
- Δ ApoE2 Arg142Cys -PEG HSA-NP mit 7,0 mg/kg Loperamid Probe 3

Die Ergebnisse des Tierversuchs zeigten eine analgetische Wirkung der ApoE3-PEG-NP-Zubereitung. Bei Betrachtung der Reaktionszeit der Tiere im Einzelnen konnte nach 90 min bei vier von acht Tieren noch ein MPE-Wert von 100% gemessen werden. Bei den Versuchen mit ApoE-Biotin / NeutrAvidin®-modifizierten NP (Vergleich Abbildung 24) hielt der hohe analgetische Effekt über 60 min an, keines der Tiere zeigte hierbei jedoch eine anhaltende Schmerzreduktion nach 90 min. Die beiden Versuche A und B zeigen im Vergleich betrachtet, dass der Rezeptor-Ligand ApoE kovalent an HSA-NP gebunden, als auch über das Avidin / Biotin-System an NP-gekoppelt zu einem Wirkstofftransport über die BHS führen kann. Beide Versuchszubereitungen deuten mit ihren analgetischen Effekten im Tierversuch darauf hin, dass ein Transport des Wirkstoffs Loperamid in das Gehirn stattfindet.

Zur Aufklärung des Transportmechanismus konnten die NP Präparationen mit ApoE2 Sendai und ApoE2 Arg142Cys beitragen. Während ApoE 3 im Vergleich zu den hier verwendeten ApoE-Derivaten zu 100% an den LDLR bindet und im Tierversuch auch eine deutliche Wirkung erzielte, konnten die Vergleichspräparationen ApoE-PEG-NP mit ApoE2 Sendai und ApoE2 Arg142Cys keinen deutlichen analgetischen Effekt zeigen. Die Tiere reagierten mit keiner verzögerten Reaktionszeit auf die Schmerzeinwirkung. Die geringe Bindungsaffinität der ApoE2 Derivate Sendai und Arg142Cys zum LDL-Rezeptor (kleiner 5%) im Zusammenhang mit der fehlenden analgetischen Wirkung dieser Derivate im Tierversuch gibt somit einen Hinweis auf die Rolle des LDL-Rezeptors für den Transport des Wirkstoffs ins Gehirn. Eine Aufnahme des Wirkstoffs bzw. der beladenen NP kann auch über andere Mitglieder der ApoE-Rezeptorenfamilie erfolgen. Der LDL-Rezeptor zeigt jedoch die höchste Expressionsrate auf der BHS.

Allgemein kann für die drei Zubereitungen festgehalten werden, dass sie von den Tieren gut vertragen wurden und keine Auffälligkeiten beim Verhalten der Tiere festgestellt werden konnten.

5. Zusammenfassung

Die BHS verhindert mit ihren engen Zell-Zellverbindungen, selektiven Transportern und einem effizienten Abwehrsystem das Eindringen vieler Stoffe in das Gehirn. Auf der einen Seite schützt diese Funktionen das Gehirn vor Zerstörung, auf der anderen Seite stellt diese Barriere gerade bei der Wirkstofftherapie vieler Hirnerkrankungen ein Problem dar. So erreichen die wenigsten Wirkstoffe zur Behandlung von Hirnerkrankungen wie Alzheimer, Meningitis oder Tumoren ihren Zielort. Daher wäre ein gezielter Transport von Arzneistoffen über die BHS von großem Nutzen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden HSA-NP entwickelt, die Arzneistoffe in das Gehirn transportieren können. Als Ligand zur Überwindung der BHS wurde Apolipoprotein E (ApoE) eingesetzt. ApoE ist ein Ligand des LDL-Rezeptors, der sich auf der Membranoberfläche von Hirnendothelzellen befindet. Mit der Wahl dieses Liganden sollte über diesen Rezeptor ein möglicher Transport in das Gehirn *in vivo* und *in vitro* untersucht werden.

5.1. Herstellung und Charakterisierung ligandenmodifizierter HSA-NP

Human Serumalbumin-Nanopartikel (HSA-NP) wurden mit dem ausgewählten Liganden ApoE modifiziert.

Neben der kovalenten direkten Kopplung des Liganden an der NP Oberfläche wurde ApoE über das Avidin/Biotin-System gebunden.

Die mögliche Bindung über das Avidin/Biotin-System wurde auf zwei Wegen untersucht: Konventions-Methode und Umkehr-Methode. Bei beiden Methoden wird über einen heterobifunktionalen Crosslinker die Avidinkomponente an die NP Oberfläche gebunden. Die beiden Methoden unterscheiden sich nur in der Richtung der Einführung des Crosslinkers. Für die Konventions-Methode wurden die HSA-NP thioliert und die zu bindende Avidinkomponente mit dem Crosslinker aktiviert. Für die Umkehr-Methode wurde die Avidinkomponente thioliert und die Partikel aktiviert. Bei beiden Methoden wurde für die Konjugation die thiolierte und die aktivierte Komponente miteinander inkubiert. Beim Vergleich der eingesetzten Methoden, Crosslinker und Avidinkomponenten ergab sich eine hohe Bindung über die Umkehr-Methode

für NeutrAvidin® von Pierce mit dem NHS-PEG-Mal-Crosslinker von Nektar mit einer Bindung von 0,026 mol NeutrAvidin®/mol HSA, während mit der Konventions-Methode bei gleichem Crosslinker und Avidinkomponente keine Bindung erzielt werden konnte. Nach erfolgter Bindung der Avidinkomponente wurde die Funktionsfähigkeit des gebundenen NeutrAvidin® untersucht. Dabei wurde in der Suspension der NeutrAvidin®-modifizierten NP das Verhältnis von Biotinbindungsstellen zu Avidinkomponente bestimmt. Ein Avidin- oder NeutrAvidin®-Molekül ist in der Lage, vier Biotinreste zu binden, bei Kopplung der Avidinderivate an Partikeloberflächen könnte diese Bindungsfähigkeit ganz oder teilweise verloren gehen. Das ermittelte Verhältnis in der NeutrAvidin®-modifizierten NP-Suspension lag bei 2,6 : 1. Trotz der Reduktion der zur Verfügung stehenden Biotinbindungsstellen nach Konjugation der Avidinkomponente an die Partikeloberfläche, standen in der erhaltenen Zubereitung genügend Bindungsstellen zur Verfügung, um biotinylierte Liganden zu binden.

Um den Liganden ApoE an NeutrAvidin®-modifizierte NP zu binden, wurde das ApoE biotinyliert und anschließend über NeutrAvidin® und seine Biotinbindungsstellen gekoppelt. Nach der Konjugation wurde die Bindungsrate des Liganden an die NP erfasst. Das Apolipoprotein zeigte eine Bindung von 85%, was einer Bindung von 3800 ApoE-Molekülen pro NP bei einer kalkulierten Partikelgröße von 340 nm entspricht

Bei der kovalenten Bindung des ApoE wurde nur die Bestimmung der ApoE Menge in der Endzubereitung durchgeführt. Es wurden verschiedene Apolipoproteine mittels NHS-PEG 3400-Mal-Crosslinker an HSA-NP gebunden. Die untersuchten Apolipoproteine zeigten eine 95%-ige Bindung an HSA-NP (19 µg ApoE/mg NP).

Ein Vergleich der Partikelherstellung von kovalent gebundenem ApoE und der Herstellung von Partikeln mit dem Avidin/Biotin-System zeigt, dass beide Wege zu einem im Tierversuch vergleichbaren Ergebnis führen. Kleine Differenzen zeigen sich bei der geringeren Stabilität der Avidin/Biotin-Partikel und dem höheren Ligandenverbrauch bei der Herstellung der kovalent gebundenen Partikel.

Für die Testung der ligandengekoppelten NP im Tierversuch wurden diese mit einem Wirkstoff beladen. Als Wirkstoff wurde Loperamid eingesetzt. Dieser Arzneistoff ist im Gehirn in der Lage an Opioidrezeptoren zu binden und analgetisch zu wirken. Loperamid ist jedoch nicht in der Lage die BHS selbstständig zu überwinden.

Bindungsstudien zeigten eine 22%-ige Bindung des Loperamids an NeutrAvidin[®]-modifizierte NP. Es wurden für die Zubereitungen 20 mg/ml NP mit 6,6 bzw. 3,3 mg/ml Loperamid beladen, das entspricht 36 bzw. 72 µg Loperamid pro mg NP.

5.2. *In vitro* Untersuchungen von ligandenmodifizierten HSA-NP

Für CLSM-Aufnahmen wurden Hep G2-Zellen und β .End3-Zellen mit ApoE-PEG-NP und NeutrAvidin[®]-modifizierten NP als Kontrolle inkubiert. Beide Zelltypen exprimieren auf ihrer Oberfläche den LDL-Rezeptor. Die Versuche zeigten andeutungsweise eine Anlagerung der ApoE-modifizierten NP an der Membranoberfläche der Zellen. In den Hep G2-Zellen zeigte sich neben der Anlagerung an die Zelloberfläche eine Anreicherung in den Zellen, während in den β .End3-Zellen keine Anreicherung der NP zu sehen war.

Neben der CLSM Auswertung der Zellen wurden FACS-Versuche mit Hep G2-Zellen durchgeführt. Hierbei zeigte sich im Vergleich zwischen PEG-NP mit und ohne ApoE eine leichte Erhöhung der prozentualen Bindung der NP an die Hep G2-Zellen. Die Bindungsaffinität der insgesamt untersuchten Partikel an die Zellen war sehr heterogen. Teilweise ließ sich dieser Umstand mit der mangelnde Konstanz in Zell- und Rezeptordichte der eingesetzten Zellen begründen.

Insgesamt sind für eine Absicherung des vermuteten Aufnahmemechanismus der ApoE-modifizierten NP über die Rezeptoren der Lipoprotein-Rezeptorfamilie weitere Zellversuche erforderlich.

5.3. *In vivo* Untersuchungen von ligandenmodifizierten HSA-NP

In Tierversuchsexperimenten konnte ein Wirkstofftransport in das Gehirn mittels ApoE-modifizierter NP gezeigt werden. Verwendet wurden für den Versuch

Mäuse, die mit Loperamid-beladenen ApoE-modifizierten NP i.v. behandelt wurden. Im Tail-Flick-Test wurde über einen Schmerzreiz gemessen, ob die injizierten NP/Loperamid-Zubereitungen zu einem analgetischen Effekt bei den Mäusen führten. Es konnte mit den Loperamid-beladenen Zubereitungen ApoE-Biotin/NeutrAvidin[®]-modifizierte NP und ApoE-PEG-NP ein analgetischer Effekt bei den Mäusen gemessen werden. Die Schmerzunempfindlichkeit der Mäuse nahm nach der einmaligen Injektion dieser Partikel innerhalb der ersten 10 min zu und hielt sich dann bis zu über 30 min, um dann langsam wieder abzusinken. Verwendet wurden Zubereitungen mit einer Loperamidkonzentration von 7,0 mg/kg Körpergewicht, aber auch bei reduzierter Wirkstoffapplikation (4,0 mg/kg Körpergewicht) konnte bei den Tieren ein analgetischer Effekt gemessen werden. Der analgetische Effekt fiel bei diesen Zubereitungen geringer aus. Die Zubereitungen ohne ApoE zeigten keinen Effekt.

Es kann also festgehalten werden, dass mit Hilfe von ApoE-gebundenen NP ein konzentrationsabhängiger Wirkstofftransport in das Gehirn möglich ist.

Zur weiteren Aufklärung des Transportmechanismus der ApoE-gekoppelten HSA-NP aus den Tierversuchen sind weitere Versuche notwendig. Zur Klärung des beteiligten Rezeptors eignen sich beispielsweise Versuche mit LDLR-defizienten Mäusen oder Zellversuche mit selektiver Blockade einzelner Rezeptoren der Lipoprotein-Rezeptorfamilie

6. Literatur

- Alberts, B., Johnson, A., and Lewis, J. (1997). Molekularbiologie der Zelle (Weinheim, VCH).
- Allémann, E., Gurny, R., and Doelker, E. (1993). Drug-loaded nanoparticles- preparation methods and drug targeting issues. *Eur J Pharm Biopharm* 39, 173-191.
- Alyautdin, R. N., Gothier, D., Petrov, V. E., Kharkevich, D. A., and Kreuter, J. (1995). Analgesic activity of the hexapeptide dalargin adsorbed on the surface of polysorbate 80-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles. *Eur J Pharm Biopharm* 41, 44-48.
- Alyautdin, R. N., Petrov, V. E., Langer, K., Berthold, A., Kharkevich, D. A., and Kreuter, J. (1997). Delivery of loperamide across the blood-brain barrier with polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *Pharm Res* 14, 325-328.
- Balthasar, S., Michaelis, K., Dinauer, N., von Briesen, H., Kreuter, J., and Langer, K. (2005). Preparation and characterisation of antibody modified gelatin nanoparticles as drug carrier system for uptake in lymphocytes. *Biomaterials* 26 (15), 2723-2732
- Barratt, G. (2003). Colloidal drug carriers: achievements and perspectives. *Cell Mol Life Sci* 60, 21-37.
- Beffert, U., Stolt, P. C., and Herz, J. (2004). Functions of lipoprotein receptors in neurons. *J Lipid Res* 45, 403-409.
- Beisiegel, U., Weber, W., Ihrke, G., Herz, J., and Stanley, K. K. (1989). The LDL-receptor-related protein, LRP, is an apolipoprotein E-binding protein. *Nature* 341, 162-164.
- Birrenbach, G., and Speiser, P. P. (1976). Polymerized micelles and their use as adjuvants in immunology. *J Pharm Sci* 65, 1763-1766.
- Blunk, T., Hochstrasser, D. F., Sanchez, J. C., Müller, B. W., and Müller, R. H. (1993). Colloidal carriers for intravenous drug targeting: plasma protein adsorption patterns on surface-modified latex particles evaluated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* 14, 1382-1387.
- Borchard, G., Audus, K. L., Shi, F., and Kreuter, J. (1994). Uptake of surfactant-coated poly(methyl methacrylate)-nanoparticles by bovine brain microvessel endothelial cell monolayers. *Int J Pharm* 110, 29-35.
- Bowman, P. D., Ennis, S. R., Rarey, K. E., Betz, A. L., and Goldstein, G. W. (1983). Brain microvessel endothelial cells in tissue culture: a model for study of blood-brain barrier permeability. *Ann Neurol* 14, 396-402.

- Brodie, B. B., Kurz, H., and Schanker, L. S. (1960). The importance of dissociation constant and lipid-solubility in influencing the passage of drugs into the cerebrospinal fluid. *J Pharmacol Exp Ther* 130, 20-25.
- Brooks, S. C., Locke, E. R., and Soule, H. D. (1973). Estrogen receptor in a human cellline (MCF-7) from breast carcinoma. *J Biol Chem* 248 (17), 6251-6253.
- Brown, R. C., Egleton, R. D., and Davis, T. P. (2004). Mannitol opening of the blood-brain barrier: regional variation in the permeability of sucrose, but not $^{86}\text{Rb}^+$ or albumin. *Brain Res* 1014, 221-227.
- Calvo, P., Gouritin, B., Chacun, H., Desmaele, D., D'Angelo, J., Noel, J. P., Georgin, D., Fattal, E., Andreux, J. P., and Couvreur, P. (2001). Long-circulating PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles as new drug carrier for brain delivery. *Pharm Res* 18, 1157-1166.
- Chen, H., Gaul, F., Guo, D., and Maycock, A. (2000). Determination of loperamide in rat plasma and bovine serum albumin by LC. *J Pharm Biomed Anal* 22, 555-561.
- Coloma, M. J., Lee, H. J., Kurihara, A., Landaw, E. M., Boado, R. J., Morrison, S. L., and Pardridge, W. M. (2000). Transport across the primate blood-brain barrier of a genetically engineered chimeric monoclonal antibody to the human insulin receptor. *Pharm Res* 17, 266-274.
- Couvreur, P., Kante, B., Grislain, L., Roland, M., and Speiser, P. (1982). Toxicity of polyalkylcyanoacrylate nanoparticles II: Doxorubicin-loaded nanoparticles. *J Pharm Sci* 71, 790-792.
- Croy, J. E., Brandon, T., and Komives, E. A. (2004). Two apolipoprotein E mimetic peptides, ApoE(130-149) and ApoE(141-155)2, bind to LRP1. *Biochemistry* 43, 7328-7335.
- de Boer, A. G., van der Sandt, I. C., and Gaillard, P. J. (2003). The role of drug transporters at the blood-brain barrier. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 43, 629-656.
- de Lange, E. C., de Boer, B. A., and Breimer, D. D. (1999). Microdialysis for pharmacokinetic analysis of drug transport to the brain. *Adv Drug Deliv Rev* 36, 211-227.
- Dergunov, A. D. (2004). Apolipoprotein E structure and substrate and receptor-binding activities of triglyceride-rich human plasma lipoproteins in normo- and hypertriglyceridemia. *Biochemistry (Mosc)* 69, 720-737.
- Dosio, F., Arpicco, S., Brusa, P., Stella, B., and Cattel, L. (2001). Poly(ethylene glycol)-human serum albumin-paclitaxel conjugates: preparation, characterization and pharmacokinetics. *J Control Release* 76, 107-117.

- Franke, H., Galla, H., and Beuckmann, C. T. (2000). Primary cultures of brain microvessel endothelial cells: a valid and flexible model to study drug transport through the blood-brain barrier in vitro. *Brain Res Brain Res Protoc* 5, 248-256.
- Gregoriadis, G., Leathwood, P. D., and Ryman, B. E. (1971). Enzyme entrapment in liposomes. *FEBS Lett* 14, 95-99.
- Gruber, H. J., Kada, G., Marek, M., and Kaiser, K. (1998). Accurate titration of avidin and streptavidin with biotin-fluorophore conjugates in complex, colored biofluids. *Biochim Biophys Acta* 1381, 203-212.
- Gurny, R., Peppas, N. A., Harrington, I., and Banker, G. S. (1981). Development of biodegradable and injectable latices for controlled release of potent drugs. *Drug Dev Ind Pharm* 7, 1-7.
- Habeeb, A. F. (1966). Determination of free amino groups in proteins by trinitrobenzenesulfonic acid. *Anal Biochem* 14, 328-336.
- Hoffmann, M., Scharnagl, H., Panagiotou, E., Banghard, W., Wieland, H., and Marz, W. (2001). Diminished LDL receptor and high heparin binding of apolipoprotein E2 Sendai associated with lipoprotein glomerulopathy. *J Am Soc Nephrol* 12, 524-530.
- Huber, J. D., Egleton, R. D., and Davis, T. P. (2001). Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends Neurosci* 24, 719-725.
- Isabel, G., Wright, D. M., and Henry, J. L. (1981). Design for an inexpensive unit for measuring tail flick latencies. *J Pharmacol Methods* 5, 241-247.
- Janzer, R. C., and Raff, M. C. (1987). Astrocytes induce blood-brain barrier properties in endothelial cells. *Nature* 325, 253-257.
- Kada, G., Falk, H., and Gruber, H. J. (1999a). Accurate measurement of avidin and streptavidin in crude biofluids with a new, optimized biotin-fluorescein conjugate. *Biochim Biophys Acta* 1427, 33-43.
- Kada, G., Kaiser, K., Falk, H., and Gruber, H. J. (1999b). Rapid estimation of avidin and streptavidin by fluorescence quenching or fluorescence polarization. *Biochim Biophys Acta* 1427, 44-48.
- Kader, A., and Pater, A. (2002). Loading anticancer drugs into HDL as well as LDL has little affect on properties of complexes and enhances cytotoxicity to human carcinoma cells. *J Control Release* 80, 29-44.
- Kratz, F., Beyer, U., and Schutte, M. T. (1999). Drug-polymer conjugates containing acid-cleavable bonds. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 16, 245-288.

- Kreuter, J., Shamenkov, D., Petrov, V., Ramge, P., Cychutek, K., Koch-Brandt, C., and Alyautdin, R. (2002). Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood-brain barrier. *J Drug Target* 10, 317-325.
- Kreuter, J. (1983). Evaluation of nanoparticles as drug delivery systems I: Preparation methods. *Pharm Acta Helv* 58, 196-209.
- Kreuter, J., and Speiser, P. (1976). New adjuvants on a polymethylmethacrylate base. *Infection and Immunity* 13, 204-210.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Langer, K., Coester, C., Weber, C., von Briesen, H., and Kreuter, J. (2000). Preparation of avidin-labeled protein nanoparticles as carriers for biotinylated peptide nucleic acid. *Eur J Pharm Biopharm* 49, 303-307.
- Lasfargues, E. Y., Coutinho, W. G., and Redfield, E. S. (1978). Isolation of two human tumor epithelial cell lines from solid breast carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 61, 967-978.
- Lewis, G. D., Figari, I., Fendly, B., Wong, W. L., Carter, P., Gorman, C., and Shepard, H. M. (1993). Differential responses of human tumor cell lines to anti-p185HER2 monoclonal antibodies. *Cancer Immunol Immunother* 37, 255-263.
- Li, Y., Ogris, M., Wagner, E., Pelisek, J., and Ruffer, M. (2003). Nanoparticles bearing polyethyleneglycol-coupled transferrin as gene carriers: preparation and in vitro evaluation. *Int J Pharm* 259, 93-101.
- Lockman, P. R., Mumper, R. J., Khan, M. A., and Allen, D. D. (2002). Nanoparticle technology for drug delivery across the blood-brain barrier. *Drug Dev Ind Pharm* 28, 1-13.
- Lück, M. (1997). Plasmaproteinadsorption als möglicher Schlüsselfaktor für eine kontrollierte Arzneistoffapplikation mit partikulären Trägern. Dissertation Freie Universität Berlin: Berlin
- Lundberg, B., Hong, K., and Papahadjopoulos, D. (1993). Conjugation of apolipoprotein B with liposomes and targeting to cells in culture. *Biochim Biophys Acta* 1149, 305-312.
- Martel, C. L., Mackic, J. B., Matsubara, E., Governale, S., Miguel, C., Miao, W., McComb, J. G., Frangione, B., Ghiso, J., and Zlokovic, B. V. (1997). Isoform-specific effects of apolipoproteins E2, E3, and E4 on cerebral capillary sequestration and blood-brain barrier transport of circulating Alzheimer's amyloid beta. *J Neurochem* 69, 1995-2004.

- Marty, J. J., Oppenheim, R. C., and Speiser, P. (1978). Nanoparticles--a new colloidal drug delivery system. *Pharm Acta Helv* 53, 17-23.
- McLeod, A. D., Lam, F. C., Gupta, P. K., and Hung, C. T. (1988). Optimized synthesis of polyglutaraldehyde nanoparticles using central composite design. *J Pharm Sci* 77(8), 704-710
- Minko, T., Kopeckova, P., and Kopecek, J. (2001). Preliminary evaluation of caspases-dependent apoptosis signaling pathways of free and HPMA copolymer-bound doxorubicin in human ovarian carcinoma cells. *J Control Release* 71, 227-237.
- Niendorf, A., and Beisiegel, U. (1991). Low-density lipoprotein receptors. *Curr Top Pathol* 83, 187-218.
- Nimpf, J., and Schneider, W. J. (2000). From cholesterol transport to signal transduction: low density lipoprotein receptor, very low density lipoprotein receptor, and apolipoprotein E receptor-2. *Biochim Biophys Acta* 1529, 287-298.
- Nykjaer, A., and Willnow, T. E. (2002). The low-density lipoprotein receptor gene family: a cellular Swiss army knife? *Trends Cell Biol* 12, 273-280.
- Okuyama T., and Satake M. (1960). On the preparation and properties of 2, 4, 6-trinitrophenylamino acids and -peptides. *J Biochem* 47, 454-457.
- Olivier, J. C., Huertas, R., Lee, H. J., Calon, F., and Pardridge, W. M. (2002). Synthesis of pegylated immunonanoparticles. *Pharm Res* 19, 1137-1143.
- Omid, Y., Campbell, L., Barar, J., Connell, D., Akhtar, S., and Gumbleton, M. (2003). Evaluation of the immortalised mouse brain capillary endothelial cell line, b.End3, as an in vitro blood-brain barrier model for drug uptake and transport studies. *Brain Res* 990, 95-112.
- Owen, A. J., Roach, P. D., Abbey, M. (2004). Regulation of low-density lipoprotein receptor activity by estrogens and phytoestrogens in a Hep G2 cell model. *Ann Nutr Metab* 48 (4), 269-275.
- Page, K. J., Hollister, R. D., and Hyman, B. T. (1998). Dissociation of apolipoprotein and apolipoprotein receptor response to lesion in the rat brain: an in situ hybridization study. *Neuroscience* 85, 1161-1171.
- Pardridge, W. M. (2002a). Drug and gene delivery to the brain: the vascular route. *Neuron* 36, 555-558.
- Pardridge, W. M. (2002b). Drug and gene targeting to the brain with molecular Trojan horses. *Nat Rev Drug Discov* 1, 131-139.

- Pardridge, W. M., Triguero, D., Yang, J., and Cancilla, P. A. (1990). Comparison of in vitro and in vivo models of drug transcytosis through the blood-brain barrier. *J Pharmacol Exp Ther* 253, 884-891.
- Pechar, M., Ulbrich, K., Subr, V., Seymour, L. W., and Schacht, E. H. (2000). Poly(ethylene glycol) multiblock copolymer as a carrier of anti-cancer drug doxorubicin. *Bioconjug Chem* 11, 131-139.
- Rajaonarivony, M., Vauthier, C., Couarraze, G., Puisieux, F., and Couvreur, P. (1993). Development of a new drug carrier made from alginate. *J Pharm Sci* 82 (9), 912-917.
- Reichel, A., Begley, D. J., and Abbott, N. J. (2003). An overview of in vitro techniques for blood-brain barrier studies. *Methods Mol Med* 89, 307-324.
- Ribalta, J., Vallve, J. C., Girona, J., and Masana, L. (2003). Apolipoprotein and apolipoprotein receptor genes, blood lipids and disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 6, 177-187.
- Riddles, P. W., Blakeley, R. L., and Zerner, B. (1979). Ellman's reagent: 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)--a reexamination. *Anal Biochem* 94, 75-81.
- Savage, M. D., Mattson, G., Desai, S., Nielander, G. W., Morgensen, S., and Conklin, E. J. (1994). Avidin-biotin chemistry: A handbook. In (Rockfortl, Illinois, USA, Pierce Chemical Company).
- Song, L., and Pachter, J. S. (2003). Culture of murine brain microvascular endothelial cells that maintain expression and cytoskeletal association of tight junction-associated proteins. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 39, 313-320.
- Stögbauer, F. (2002). Beeinflussung der Funktion der Blut-Hirn-Schranke durch elektromagnetische Felder. In (Edition Wissenschaft), pp. 3-7.
- Torchilin, V. P. (2000). Drug targeting. *Eur J Pharm Sci* 11 Suppl 2, S81-91.
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354.
- Trempe, G. L. (1976). Human breast cancer in culture. *Recent Results. Cancer Res*, 33-41.
- Tröster, S. D., Müller, U., and Kreuter, J. (1990). Modification of the body distribution of poly(methyl methacrylate) nanoparticles in rats by coating with surfactants. *Int J Pharm* 61, 85-100.

- van Eick, A. J. (1967). A change in the response of the mouse in the "hot plate" analgesia-test, owing to a central action of atropine and related compounds. *Acta Physiol Pharmacol Neerl* 14, 499-500.
- Verdun, C., Brasseur, F., Vranckx, H., Couvreur, P., and Roland, M. (1990). Tissue distribution of doxorubicin associated with polyisohexylcyanoacrylate nanoparticles. *Cancer Chemother Pharmacol* 26, 13-18.
- Wartlick, H., Michaelis, K., Balthasar, S., Strebhardt, K., Kreuter, J., and Langer, K. (2004). Highly specific HER2-mediated cellular uptake of antibody-modified nanoparticles in tumor cells. *J Drug Target* 12 (7), 461-471
- Weber, C., Coester, C., Kreuter, J., and Langer, K. (2000a). Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles. *Int J Pharm* 194, 91-102.
- Weber, C., Kreuter, J., and Langer, K. (2000b). Desolvation process and surface characteristics of HSA-nanoparticles. *Int J Pharm* 196, 197-200.
- Weber, C., Reiss, S., and Langer, K. (2000c). Preparation of surface modified protein nanoparticles by introduction of sulfhydryl groups. *Int J Pharm* 211, 67-78.
- Wenisch, S., Steinmetz, T., Fortmann, B., Leiser, R., and Bitsch, I. (1996). Can megadoses of thiamine prevent ethanol-induced damages of rat hippocampal CA1 pyramidal neurones? *Z Ernährungswiss* 35, 266-272.
- Widder, K. J., Marino, P. A., Morris, R. M., Howard, D. P., Poore, G. A., and Senyei, A. E. (1983). Selective targeting of magnetic albumin microspheres to the Yoshida sarcoma: ultrastructural evaluation of microsphere disposition. *Eur J Cancer Clin Oncol* 19, 141-147.
- Yarden, Y., and Ullrich, A. (1988). Molecular analysis of signal transduction by growth factors. *Biochem* 27(9):3113-3119. Review
- Zhang, Y., Jeong Lee, H., Boado, R. J., and Pardridge, W. M. (2002). Receptor-mediated delivery of an antisense gene to human brain cancer cells. *J Gene Med* 4, 183-194.

7. Lebenslauf

Name: Kerstin Andrea Michaelis
 Geb.: Resch
 Adresse: Marie-Luise-Kaschnitz Strasse 2
 60439 Frankfurt
 Geburtsdatum: 25.06.1975
 Geburtsort: Detmold
 Familienstand: verheiratet, ein Kind

Schulausbildung:

Aug 1982 – Juni 1986 Grundschole/Friedrichsdorf-Burgholzhausen
 Aug 1986 – Juni 1995 Phillip-Reis-Schole/Friedrichsdorf

Schulabschluss:

21. Juni 1995 Abitur

Studium und Qualifikationen:

Okt 1995 – Okt 2000 Studium der Pharmazie an der
 Johann Wolfgang Goethe-Universität
 Frankfurt a. M.
 August 1998 1. Staatsexamen
 Oktober 2000 2. Staatsexamen
 November 2001 3. Staatsexamen
 Nov 2000 – April 2001 Pharmazie-Praktikum in der
 „Apotheke im Hauptbahnhof“ in
 Frankfurt a. M.
 Mai 2001 – Okt 2001 Pharmazie-Praktikum am Institut für
 Pharmazeutischen Technologie
 J. W. Goethe-Universität in Frankfurt a.M.

Okt 2001 – Sept 2004	Promotion am Institut für Pharmazeutische Technologie J. W. Goethe-Universität in Frankfurt a.M.
ab Mai 2001	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmazeutische Technologie J. W. Goethe-Universität in Frankfurt a.M.

Wissenschaftliche Veröffentlichungen:

Michaelis, K., Hoffmann, M., Herbert, E., Alyautdin, R. N., Michaelis, M., Kreuter, J., and Langer, K. (submitted) Covalent linkage of apolipoprotein E to albumin-nanoparticles strongly enhances drug transport into the brain

Balthasar, S., Michaelis, K., Dinauer, N., von Briesen, H., Kreuter, J., and Langer, K. (2005). Preparation and characterisation of antibody modified gelatin nanoparticles as drug carrier system for uptake in lymphocytes. *Biomaterials* 26 (15), 2723-2732

Wartlick, H., Michaelis, K., Balthasar, S., Strebhardt, K., Kreuter, J., and Langer, K. (2004). Highly specific HER2-mediated cellular uptake of antibody-modified nanoparticles in tumor cells. *J Drug Target* 12 (7), 461-471
